

Identifizierung neuer MuRF-Multiproteinkomplex assoziierter Proteine

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des akademischen Grades
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m
(Dr. rer. nat.)
im Fach Biologie
eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin
von

Diplom-Biologe Marcel Nowak

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Stefan Hecht

Gutachter:

1. Prof. Dr. Thomas Sommer
2. Prof. Dr. Claus Scheidereit
3. Prof. Dr. Wolfgang Dubiel

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Juli 2014

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ZUSAMMENFASSUNG	V
ABSTRACT	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Die Muskulatur	1
1.1.1 Die quergestreifte Muskulatur	1
1.1.2 Die Skelettmuskulatur	2
1.1.3 Die Herzmuskulatur	2
1.1.4 Das Sarkomer und Kraftgenerierung	3
1.2 Protein-Homöostase im Muskel.....	4
1.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System	4
1.3.1 Der Ubiquitinierungs-Mechanismus.....	5
1.3.2 E3-Ubiquitin-Ligasen.....	6
1.3.3 Multiproteinkomplexe der RING-finger E3-Ubiquitin-Ligasen	7
1.4 Muscle RING-Finger Proteine (MuRFs)	8
1.5 Involvierung der MuRFs in Muskelkrankheiten	11
1.6 Zielsetzung der Arbeit	12
2 MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 Verwendete Materialien	14
2.1.1 Chemikalien	14
2.1.2 Geräte	14
2.1.3 Bakterienstämme	15
2.1.4 Zelllinien.....	15

II Inhaltsverzeichnis

2.1.5	Adenoviren	16
2.1.6	Plasmide	16
2.1.7	Oligonukleotide	16
2.1.8	siRNAs	18
2.1.9	Kulturmedien	18
2.1.9.1	Kulturmedien für die Bakterienanzucht	18
2.1.9.2	Zellkulturmedien	19
2.1.10	Antikörper	19
2.1.10.1	Primäre Antikörper	19
2.1.10.2	Sekundäre Antikörper	19
2.1.11	Fluoreszenzmikroskop Filtersätze	20
2.1.12	Fluoreszenzmikroskop Objektive	20
2.2	Methoden.....	20
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	20
2.2.1.1	Polymerase-Kettenreaktion.....	20
2.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese	21
2.2.1.3	Restriktionsverdau	21
2.2.1.4	Ligation	22
2.2.1.5	Transformation von <i>E. coli</i>	22
2.2.1.6	Isolierung von Plasmid-DNA	23
2.2.1.7	Gateway-Klonierungen	23
2.2.1.8	DNA-Sequenzierungen	24
2.2.2	Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente	24
2.2.3	Biochemische Methoden	25
2.2.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	25
2.2.3.2	Immunblot	26
2.2.3.3	Affinitätschromatographien	27
2.2.3.3.1	Aufreinigung eukaryotisch hergestellter Proteine	28
2.2.3.3.2	Ko-Immunpräzipitations-Experimente	29
2.2.3.3.3	SILAC-AP-MS.....	29
2.2.3.3.4	Aufreinigung prokaryotisch hergestellter Proteine	30
2.2.3.4	Direkte Protein-Protein-Interaktionsstudien	31
2.2.3.5	Massenspektrometrie.....	31
2.2.4	Zellbiologische Methoden und Mikroskopie	31
2.2.4.1	Zellkultur	31
2.2.4.2	Herstellung von Gesamtzellextrakten	32
2.2.4.3	Transiente Transfektionen.....	32
2.2.4.3.1	Liposomale Transfektionen	32
2.2.4.3.2	siRNA-Transfektionen	33

2.2.4.3.3	Transiente adenovirale Transduktionen	34
2.2.4.4	Cycloheximid-Abbau-Experimente.....	34
2.2.4.5	Fixierung und Permeabilisierung von Zellen.....	34
2.2.4.6	Darstellung des Aktinzytoskeletts	34
2.2.4.7	Indirekte Immunfluoreszenz.....	35
2.2.4.8	Fluoreszenzmikroskopie.....	35
2.2.5	Tierexperimentelle Arbeiten.....	35
2.2.5.1	Transverse Aorten-Konstriktion	35
2.2.5.2	Hunger induzierte Skelettmuskelatrophie.....	36
2.2.5.3	Denervations-induzierte Skelettmuskelatrophie.....	36
3	ERGEBNISSE	37
3.1	Identifizierung neuer MuRF-Interaktionspartner	37
3.1.1	Hochdurchsatz Hefe-Zwei-Hybrid-Screening.....	37
3.1.2	Identifizierung neuer MuRF-Interaktionspartner mittels SILAC-AP-MS	44
3.1.3	Vergleich der Datensätze, Datenanalyse sowie Selektion	51
3.1.4	Bestätigung ausgewählter Y2H und SILAC-AP-MS identifizierter MuRF Protein-Protein Interaktionen mittels Ko-Immunpräzipitation.....	53
3.2	Charakterisierung ausgewählter MuRF-Interaktionen	57
3.2.1	Cycloheximid-Abbau-Experimente geben Hinweise auf die funktionelle Bedeutung der neu identifizierten MuRF-PPI	57
3.2.2	Charakterisierung von MuRF-MuRF Interaktionen.....	60
3.2.3	Charakterisierung der MuRF1-MYLK2 Interaktion	69
3.3	Charakterisierung der MuRF1-WDR42A Interaktion.....	71
3.3.1	WDR42A wird ubiquitär synthetisiert.....	72
3.3.2	WDR42A wird während der Muskeldifferenzierung in C2C12-Zellen zunehmend synthetisiert	73
3.3.3	MuRF1 und 3 kolokalisieren mit WDR42A.....	76
3.3.4	Direkte MuRF1 WDR42A Interaktion	81
3.3.5	WDR42A wird wie MuRF1 unter Skelettmuskelatrophie vermehrt hergestellt.....	84
3.3.6	Herunterregulation von WDR42A in C2C12 Myotuben führt zu Atrophie-Resistenz.....	87

4	DISKUSSION	90
4.1	Identifizierung neuer MuRF-Interaktionspartner.....	90
4.1.1	Identifizierung neuer MuRF-Iap durch Hochdurchsatz Y2H-Screenings.....	90
4.1.2	Identifizierung neuer MuRF-Iap durch SILAC-AP-MS.....	93
4.1.3	Zwei unterschiedliche Screening-Methoden führen zur Identifizierung von elf neuen MuRF-Interaktionspartnern.....	95
4.2	Charakterisierung ausgewählter MuRF-Interaktionspartner.....	98
4.2.1	Thesen zur funktionellen Bedeutung einiger neuer MuRF-Iap.....	98
4.2.2	Heterooligomerisierungen beeinflussen die Funktion der MuRF-Proteine	99
4.2.3	MYLK2 potentielle Rolle bei der Regulation der MuRF1 Aktivität durch Phosphorylierung ...	102
4.2.4	WDR42A als Regulator der MuRF1 abhängigen Skelettmuskelatrophie	103
4.2.4.1	Ubiquitäres WDR42A weist gewebespezifische Expressionsmuster auf	105
4.2.4.2	WDR42A in der Muskelentwicklung.....	106
4.2.4.3	WDR42A ist ein vorwiegend zytoplasmatisches Protein	106
4.2.4.4	WDR42A kolokalisiert mit MuRF1 und 3 im Zytoplasma von Muskelzellen.....	108
4.2.4.5	Die Interaktion von MuRF1 und WDR42A könnte durch PTMs reguliert werden	109
4.2.4.6	Verringerung der endogenen WDR42A Proteinmenge führt zu Atrophie-Resistenz in C2C12 Myotuben	110
	LITERATURVERZEICHNIS	113
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	120
	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	123
	TABELLENVERZEICHNIS.....	125
	PUBLIKATIONEN UND VORTRÄGE.....	126
	DANKSAGUNG	127
	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....	128

Zusammenfassung

Die *Muscle-RING-finger* (MuRF) Proteine (1, 2 und 3) sind hoch homologe E3-Ubiquitin-Ligasen, die im Muskelgewebe den Ubiquitin-Proteasom-System abhängigen Abbau von Proteinen vermitteln. MuRF1 wird in der Muskelatrophie verstärkt synthetisiert, was zu einem gesteigerten Proteinabbau und damit zum Verlust von Muskelmasse führt. Zudem sind Mäuse, denen MuRF1 fehlt vor Muskelatrophie geschützt. E3-Ubiquitin-Ligasen fungieren oftmals in Multiproteinkomplexen. Dies wurde für MuRF-Proteine bisher nicht gezeigt. Aufgrund dessen sollten neue MuRF-Multiproteinkomplex assoziierte Faktoren mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System und SILAC AP-MS identifiziert und deren Einfluss auf die MuRF-Funktion charakterisiert werden. Es wurden sowohl neue als auch publizierte MuRF-Interaktionspartner (Iap) entdeckt. Die Identifizierung der bekannten Iap belegt die Spezifität der durchgeführten Screens. Von den neu entdeckten MuRF-Iap wurde der Fokus auf WDR42A gelegt, da das Protein mit beiden o.g. Methoden identifiziert wurde und zudem funktionell hoch interessant ist. WDR42A besitzt sieben hintereinander angeordnete WD40-Repeat Domänen. Eine solche Domänenanordnung führt in WDR42A homologen Proteinen zu der Ausbildung zirkulärer β -Propeller Strukturen, die als Protein-Interaktionsplattformen dienen und so Multiproteinkomplexe koordinieren. Die Interaktion zwischen MuRF-Proteinen und WDR42A wurde mittels Ko-IP Experimenten und Koloalisationsstudien bestätigt. Diese Analysen zeigten, dass WDR42A spezifisch mit MuRF1 und 3 interagiert. Cycloheximid-Abbau-Experimente deuten darauf hin, dass WDR42A kein MuRF1 Substrat-Protein ist. Da die MuRF-Proteine spezifisch im Muskel hergestellt werden, sollte überprüft werden ob WDR42A ebenfalls im Muskelgewebe synthetisiert wird. Es wurde gezeigt, dass WDR42A ubiquitär sowie im Muskelgewebe und in immortalisierten Muskelzellen hergestellt wird. Analog zu MuRF1 wird WDR42A in der Denervations-induzierten Skelettmuskelatrophie und der Muskelentwicklung verstärkt synthetisiert. Die Herunterregulation von WDR42A mittels siRNA in C2C12 Myotuben schützte diese Zellen vor dem Auftreten von Atrophie. Diese Ergebnisse zeigen, dass WDR42A wie MuRF1 an der Entstehung von Muskelatrophie beteiligt ist. Aufgrund der WDR42A Domänenstruktur wird vermutet, dass WDR42A als Scaffolding-Protein MuRF1-Multiproteinkomplexe reguliert. Schlagwörter: MuRF, E3-Ubiquitin-Ligase, UPS, Muskelatrophie, Y2H, SILAC-AP-MS, Multiproteinkomplex, PPI, WDR42A

Abstract

The muscle-RING-finger (MuRF) proteins (1, 2 und 3) are highly homologues E3 ubiquitin ligases which coordinate the ubiquitin-proteasome system dependent protein degradation in muscle tissue. MuRF1 is up-regulated under muscle atrophy conditions. This leads to enhanced proteolysis and thereby to loss of muscle mass and strength. Furthermore are MuRF1 knockout mice resistant to muscle atrophy. E3 ubiquitin ligases often operate in multi-protein complexes. This has not been shown for MuRF proteins. Therefore we used yeast-two-hybrid and SILAC-AP-MS to identify and subsequently characterize new MuRF multi-protein complex associated proteins. We found new and also published MuRF interaction partners (Iap) with both methods. The identification of known MuRF-Iap indicates the high degree of specificity of our screens. Amongst the new Iap, we focused on WDR42A, because it was found with both techniques and his interesting functional potential. WDR42A exhibits seven consecutive arranged WD40-repeat domains. This domain arrangement leads in homologues proteins to the formation of seven-bladed β -propeller structures, which act as protein interaction platforms that coordinate multi-protein complexes. The protein interaction between the MuRFs and WDR42A was confirmed with Co-IP and co-localization experiments. These analyses showed that WDR42A specifically binds MuRF1 and MuRF3. Cycloheximide decay experiments indicated that WDR42A is not a MuRF1 substrate protein. The MuRF proteins are muscle specific, therefore we tested if WDR42A is also synthesized in muscle tissue. We could show that WDR42A is ubiquitously, but also in muscle tissue as well as in immortalized muscle cells produced. WDR42A is similar to MuRF1 up-regulated under denervation-induced skeletal muscle atrophy as well as in muscle development. Furthermore are C2C12 myotubes resistant to muscle atrophy after siRNA down-regulation of WDR42A. These results demonstrate that WDR42A is like MuRF1 important for the development of muscle atrophy. Due to the domain structure of WDR42A, we hypothesize that WDR42A regulates MuRF1 multi protein complexes as scaffolding protein.

Keywords: MuRF, E3 ubiquitin ligase, UPS, Muscle atrophy, Y2H, SILAC-AP-MS, Multi-protein complex, PPI, WDR42A

1 Einleitung

1.1 Die Muskulatur

Die vier Grundgewebsarten der Eumetazoa sind das Muskelgewebe, Epithelgewebe, Bindegewebe und das Nervengewebe. Die Muskulatur befähigt Gewebetiere einerseits zur zielgerichteten Bewegung und ist andererseits essentiell für die Aufrechterhaltung der Funktionalität vieler innerer Organe. Die Charakteristik aller Muskeln, Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) in Motilität umzusetzen, basiert auf der Kontraktionsfähigkeit der Muskeln. Diese Fähigkeit wird auf molekularer Ebene durch Sarkomere, den kleinsten repetitiven Elementen des Muskels ermöglicht. Sarkomere bestehen aus einem komplexen Netzwerk strukturgebender Proteine, welche alle auf Aktin- und Myosin-Protein-Filamentsystemen zur Kraftgenerierung basieren [1]. Dies bedeutet letztendlich, dass die Funktionalität der Sarkomere und damit auch der Muskulatur auf der korrekten Assemblierung, Funktionsfähigkeit und Recycling der beteiligten Proteine basiert. Dysregulationen im regulierten zielgerichteten Proteinabbau können zur Entwicklung von muskulären Krankheiten (z.B. Skelettmuskelatrophie oder Herzmuskelhypertrophie) beitragen [2-5].

1.1.1 Die quergestreifte Muskulatur

Aufgrund erheblicher Unterschiede des histologischen Erscheinungsbildes werden zwei Muskelgewebsarten differenziert: die quergestreifte und die glatte Muskulatur. Die quergestreifte Skelett- und Herzmuskulatur weist bei der Betrachtung unter dem Mikroskop charakteristische periodisch wiederholende Querstreifenmuster auf, die der glatten Muskulatur der inneren Organe, wie z.B. der Darm- und Gefäßmuskulatur, fehlen. Die Querstreifung resultiert aus der systematischen Anordnung von dünnen (Aktin) und dicken (Myosin) Filamenten der Sarkomere, die aufgrund unterschiedlicher Lichtbrechung als alternierendes Muster dunkler (isotrop) und heller (anisotrop) Banden erscheinen [1, 2].

1.1.2 Die Skelettmuskulatur

Die Skelettmuskulatur der höheren Tiere ermöglicht dessen aktive, zielgerichtete und willkürliche Körperbewegung (Körperstatik und -motorik). Sie ist bis auf wenige Ausnahmen (z.B. Zungen-, Zwerchfell- oder Kehlkopfmuskulatur) immer über Sehnen mit dem Skelett verbunden. Der individuelle Muskel besteht aus parallel angeordneten Muskelfaserbündeln. Diese setzen sich aus parallel angeordneten lang gestreckten Zellen, auch Muskelfasern genannt, zusammen. Die Muskelfasern entstehen durch die Fusion von vielen Skelettmuskelvorläuferzellen (Myoblasten). Durch die Verschmelzung der Myoblasten entstehen somit große mehrkernige Synzytien. Diese sind charakterisiert durch randständige direkt unter dem Sarkolemm (Plasmamembran des Muskels) liegende Zellkerne. Im Inneren der Muskelfaser sind viele Sarkomere der Länge nach parallel zueinander angeordnet und bilden sogenannte Myofibrillen, welche von einem modifizierten endoplasmatischen Retikulum (ER), dem sarkoplasmatischem Retikulum (SR) umgeben sind. Das SR speichert u.a. die für die Kontraktion wichtigen Kalziumionen und setzt diese nach einem Aktionspotential durch einen mit dem Muskel verbundenen Nerv in das Sarkoplasma der Muskelzellen frei. Dies löst das Ineinandergleiten der dünnen Aktin- und dicken Myosin-Filamentsysteme des Sarkomers und damit auch das Kontrahieren des Muskels (siehe Gleitfilamenttheorie, Abschnitt 1.1.4) aus. Nach der Kontraktion wird Kalzium wieder aktiv in das SR zurückgepumpt und bis zur erneuten Kontraktion gespeichert [2, 6].

1.1.3 Die Herzmuskulatur

Die Herzmuskulatur (Myokard) wird wie die Skelettmuskulatur aufgrund ihres grundsätzlichen Aufbaus ebenfalls zur quergestreiften Muskulatur gezählt. Sie unterscheidet sich jedoch von der Skelettmuskulatur in einigen wesentlichen Punkten. Die Herzmuskulatur unterliegt, vergleichbar mit der glatten Muskulatur, keiner willkürlichen Kontrolle. Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) sind keine polynukleären Synzytien, sondern besitzen in der Regel nur einen einzelnen zentralisierten Zellkern. Außerdem weisen Kardiomyozyten keine langgezogene faserartige, sondern eine eher Y-förmige Struktur auf. Die Zellen sind im Verbund geflechtartig angeordnet. Ein weiteres wichtiges Unterscheidungsmerkmal der Herzmuskelzellen von Skelettmuskelzellen ist dessen spezielle Verbindung untereinander, welche für die synchronisierte Kontraktion des Herzens essentiell ist. Herzmuskelzellen sind über

spezielle Zell-Zell-Kontakte, den Glanzstreifen (*intercalated discs*), mechanisch und elektrisch miteinander gekoppelt. Die Glanzstreifen setzen sich aus drei unterschiedlichen Arten von Zell-Zell-Verbindungen zusammen: *Maculae adhaerentes*, *Fasciae adhaerentes* und den *Gap junctions*. Die mechanische Verbindung der Muskelzellen erfolgt zum einen über Desmosomen (*Maculae adhaerentes*), welche die Intermediärfilamente benachbarter Zellen verbinden sowie zum anderen über Aktinfilament verbindende Adhäsionsverbindungen (*Fasciae adhaerentes*). Diese beiden, normalerweise voneinander getrennten Zellverbindungen, sind in Kardiomyozyten in einer sogenannten *Area composita* amalgamiert [7-10]. Die elektronische Kopplung der Kardiomyozyten erfolgt über den dritten Zell-Zell-Verbindungstyp der Glanzstreifen, den *Gap junctions*. Die Proteinkomplexe der *Gap junctions* bestehen aus Connexinen, die Kanäle bilden, welche benachbarte Zellen verbinden. Dadurch ist der Austausch von Zytoplasma, Ionen oder kleiner Moleküle von einer Zelle zur anderen und damit auch die Weiterleitung der kontraktions-kontrollierenden Aktionspotentiale gewährleistet [11]. Die Gesamtheit der miteinander verbundenen Kardiomyozyten des Herzmuskels bilden somit ein funktionelles Synzytium [2].

1.1.4 Das Sarkomer und Kraftgenerierung

Die kleinste sich wiederholende und kraftgenerierende Einheit der Muskeln ist das Sarkomer. Es besteht hauptsächlich aus den vier Filament-aufbauenden Proteinen Aktin, Myosin, Titin und Nebulin sowie assoziierten Verankerungs- und Regulationsproteinen [1]. Jedes Sarkomer wird beidseitig durch die sogenannten Z-Scheiben, einem Multiproteinkomplex aus Struktur- und Verankerungsproteinen, begrenzt. Das dünne Aktinfilamentsystem ist mit der Z-Scheibe über das Protein α -Aktinin verbunden. Die ausschließlich aus dünneren lichtdurchlässigeren Aktinfilamenten bestehende und somit hellere I-Bande (isotrop) zieht sich ausgehend von der Z-Scheibe in die Mitte des Sarkomers. Zur Mitte hin überlappt die I-Bande mit der weniger lichtdurchlässigen und damit dunkleren aus Myosinfilamenten bestehenden A-Bande (anisotrop). Die Myosinfilamente der A-Bande wiederum sind in der Mitte in der sogenannten M-Bande verankert. Ein drittes Filamentsystem, bestehend aus dem größten bekannten Wirbeltier-Protein (Titin), verbindet die Z-Scheibe mit der M-Linie. Titin ist in der Z-Scheibe ebenfalls über α -Aktinin verankert und fungiert als elastische „molekulare Feder“ des Sarkomers [12, 13]. Durch das Ineinandergleiten der Aktin- und

Myosinfilamentsysteme kommt es zur Verkürzung der Sarkomere und damit auch des Muskels (Gleitfilamenttheorie [14, 15]). Die gleichzeitige Verkürzung vieler hintereinandergeschalteter Sarkomere in sogenannten Myofibrillen der Muskelzellen führt makroskopisch zur Verkürzung und somit zur Kontraktion des Muskels [1, 2].

1.2 Protein-Homöostase im Muskel

Muskeln sind in ständiger Bewegung und aufgrund dessen obliegen muskelstrukturbildende Proteine einer stetigen Abnutzung. Kommt es zur irreparablen Schädigung einzelner Proteine, werden diese zielgerichtet entfernt und erneuert. Für die korrekte Funktionalität der Sarkomere ist deshalb eine präzise Kontrolle des Gleichgewichts zwischen Proteinsynthese und Proteinabbau von entscheidender Bedeutung [3, 16]. Fehlfunktionen in diesen Prozessen können zur Entwicklung von Muskelkrankheiten sowie zur Dysfunktionalität des Muskels beitragen. Werden insgesamt mehr Proteine synthetisiert als degradiert, kann dies zum pathologischen Aufbau von Muskelmasse führen. Diese Entwicklungen sind in verschiedenen kardialen Hypertrophien wie z.B. in der Linksherzhypertrophie belegt [4]. Kommt es jedoch zum übermäßigen Abbau von Muskelproteinen, führt dies zu Muskelatrophie, die zur Schwächung der Muskelfunktionalität führt [17]. Der kontrollierte Proteinabbau im Muskel wird im Wesentlichen durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), das Autophagie- und das Calpain-System koordiniert [18]. Die Autophagozytose spielt hauptsächlich bei der Degradation von größeren Proteinkomplexen sowie membranständigen Proteinen und defekten Organellen eine wichtige Rolle. Das mit Abstand wichtigste Degradations-System für den zielgerichteten spezifischen Abbau von fehlgefalteten oder nicht-funktionellen Proteinen des Muskelgewebes stellt das Ubiquitin-Proteasom-System dar [18]. Aufgrund dessen ist das UPS für die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen Synthese und Abbau von Proteinen des Muskelgewebes essentiell.

1.3 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das aus 76 Aminosäuren (AS) bestehende Ubiquitin (von ubiquitär) ist ein hoch konserviertes, in allen Eukaryoten und in allen Zellen vorkommendes Polypeptid [19]. Das UPS konjugiert das Ubiquitin (Ub) als posttranslationale Modifikation (PTM)

zielgerichtet und spezifisch auf Substrat-Proteine. Je nach Art sowie Anzahl der Ubiquitin-Bindungen mit dem Substrat-Protein, kann diese PTM die Eigenschaften und Funktionen der Substrat-Proteine verschiedenartig modulieren [20]. Monoubiquitinierungen sowie Multi-Monoubiquitinierungen können Einfluss auf die Lokalisierung der Substrat-Proteine haben, Bindungspartner rekrutieren oder dessen Bindungen inhibieren sowie die Aktivität des jeweiligen Substrat-Proteins mannigfaltig modulieren. Des Weiteren können Ubiquitin-Reste miteinander über interne Lysine (K) des Ubiquitins zu Ketten (Polyubiquitinketten) verknüpft werden. Ubiquitin enthält insgesamt sieben Lysin-Reste (K6, 11, 27, 29, 33, 48, 63). Die Länge und der Verzweigungsgrad der Polyubiquitinkette können sich stark unterscheiden und werden maßgeblich durch das an der Bindung beteiligte Lysin definiert. Die gebildeten Ketten unterscheiden sich daraufhin in ihrer Struktur und beeinflussen die Funktion des Substrat-Proteins [20]. Unterschiedlich (poly)ubiquitinierte Substrat-Proteine haben entscheidenden Einfluss auf die Regulation der Signaltransduktion, Zellzykluskontrolle und die Proteinqualitätskontrolle sowie auf den intrazellulären Membrantransport, die Transkription und Translation sowie DNA-Reparaturmechanismen. Die in dieser Arbeit entscheidende Funktion des UPS ist dessen Rolle beim regulierten Abbau von Proteinen. In der Regel gelten K48 und K11 Polyubiquitinketten als Degradationssignale, welche daraufhin durch das 26S-Proteasom erkannt und abgebaut werden [21, 22]. Die Ubiquitinierung von Proteinen kann durch deubiquitinierende Proteine (DUBs) rückgängig gemacht werden. DUBs sind Proteasen, die das konjugierte Ubiquitin von den Substrat-Proteinen proteolytisch abspalten können [23]. Dysregulationen des UPS im Muskel können die Entstehung von Skelett- und Herzmuskelatrophie sowie -hypertrophie beeinflussen [3, 4] und wurden außerdem mit Krebs, neurodegenerativen Krankheiten und Immundefekten in Verbindung gebracht [24].

1.3.1 Der Ubiquitinierungs-Mechanismus

Die Ubiquitinierung von Substrat-Proteinen wird durch eine Kaskade von drei hierarchisch agierenden Enzymen (E1, E2 und E3) gewährleistet. In dieser Multi-Enzym Reaktionskette wird zunächst das Ubiquitin in einer ATP-abhängigen Reaktion an das aktive Zentrum eines E1 (Ubiquitin-aktivierendes) Enzyms gebunden und somit aktiviert. Die hochenergetische Thioesterbindung der beiden Proteine entsteht zwischen der Carboxygruppe eines C-terminalen Glycins vom Ubiquitin und eines Cystein-Restes

des E1 Enzyms. Das Ubiquitin wird anschließend vom E1 Enzym mittels einer weiteren Thioesterbindung auf einen Cystein-Rest des beteiligten E2 (Ubiquitin-konjugierendes Enzym) übertragen. Im letzten Schritt der Kaskade wird Ubiquitin durch ein spezifisches E3 Enzym (auch E3-Ubiquitin-Ligase genannt) auf das Substrat-Protein übertragen. Die E3-Ubiquitin-Ligase katalysiert die Entstehung einer kovalenten Isopeptidbindung zwischen dem C-terminalen Glycin vom Ubiquitin mit einer ϵ -Aminogruppe eines Lysin-Restes des Substrates. Dieser Prozess kann periodisch wiederholt werden wodurch Polyubiquitinketten entstehen [19, 25].

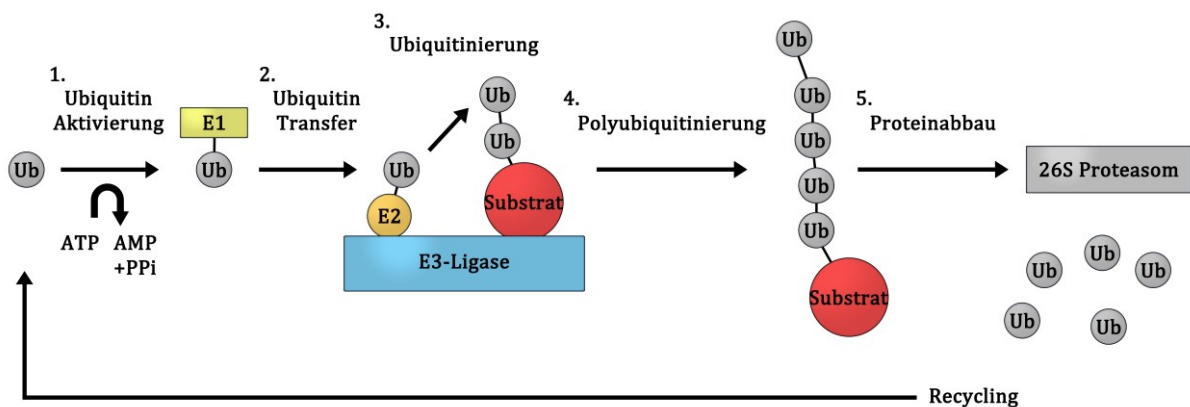


Abbildung 1: Der Ubiquitinierungs-Mechanismus. 1. Ubiquitin wird in einer ATP-abhängigen Reaktion durch die Bindung an ein E1 Enzym aktiviert. 2. Daraufhin wird das aktivierte Ubiquitin auf ein E2 Enzym transferiert. 3. Das Ubiquitin gebundene E2 Enzym interagiert mit einer Substrat gebundenen E3-Ubiquitin-Ligase. Anschließend wird das Ubiquitin von dem E2 Enzym auf das Substrat-Protein übertragen. 4. Dieser Mechanismus kann mehrmals wiederholt werden, wodurch eine Polyubiquitinkette entsteht. 5. Wurde das Substrat-Protein mit einer K48 Polyubiquitinkette markiert, wird das Substrat-Protein anschließend durch das 26S-Proteasom erkannt und degradiert. Die freigesetzten Ubiquitin-Proteine und proteolytisch entstandene Peptide können anschließend wieder verwendet werden. Abbildung modifiziert nach KEGG pathway „Ubiquitin mediated proteolysis“ [26, 27].

1.3.2 E3-Ubiquitin-Ligasen

Grundsätzlich werden zwei E3-Ubiquitin-Ligase Proteinfamilien, HECT (*Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*) und RING- (*really interesting new gene*) finger E3-Ubiquitin-Ligasen aufgrund ihres unterschiedlichen Ubiquitin-Konjugations-Mechanismus unterschieden (Abbildung 2) [28]. HECT E3-Ubiquitin-Ligasen binden das von E2 Enzymen akzeptierte Ubiquitin direkt und übertragen es anschließend auf das gleichzeitig an das E3 gebundene Substrat [29]. RING-finger E3-Ubiquitin-Ligasen übertragen das Ubiquitin nicht direkt, sondern vermitteln den Transfer mithilfe von E2 Enzymen [24]. RING-finger E3-Ubiquitin-Ligasen binden zunächst das Substrat-Protein. Anschließend kommt es zu einer Interaktion mit einem Ubiquitin beladenem E2 Enzym, welches das Ubiquitin auf das Substrat überträgt [30]. In allen Organismen sind bisher ausschließlich zwei verschiedene E1 Enzyme, ungefähr 40 E2 Enzyme und mehrere

Hundert E3-Ubiquitin-Ligase beschrieben worden. Dies zeigt eindeutig die Hierarchie des Ubiquitin-Proteasom-Systems. In der Regel überträgt ein aktivierendes E1 Enzym das Ubiquitin auf eines von vielen E2 Enzymen, welches jeweils ein gewisses Kontingent an E3-Ubiquitin-Ligasen bindet. Die E3-Ubiquitin-Ligasen sind letztendlich die Proteine im System, die die Substrate binden und somit die Spezifität des Systems garantieren [28].

1.3.3 Multiproteinkomplexe der RING-finger E3-Ubiquitin-Ligasen

Die Mehrheit der E3-Ubiquitin-Ligasen zählt zu der Familie der RING-finger oder RING-finger verwandten Ligasen wie PHD- (*Plant Homeodomain*), LAP- (*leukemia associated protein*) und U-Box Domäne Proteine [30, 31]. RING-finger E3-Ubiquitin-Ligasen übertragen Ubiquitin indirekt über ein Ubiquitin gebundenes E2 Enzym auf das Substrat-Protein [31]. Jedoch wird die Proteinfamilie des Weiteren in Single- und Multiproteinkomplex RING-finger E3-Ubiquitin-Ligasen unterteilt (Abbildung 2). Single E3-Ubiquitin-Ligasen binden das Substrat-Protein direkt und vermitteln die Ubiquitin-Konjugation mittels eines ebenfalls direkt gebundenen und Ubiquitin beladenem E2 Enzym. Dem hingegen agieren einige RING-finger E3-Ubiquitin-Ligasen in großen Multiproteinkomplexen. In diesen wird das Substrat durch Substrat-Adapter-Proteine gebunden, welche wie die E3-Ubiquitin-Ligase Untereinheit an Scaffold-Proteinen gebunden sind und somit die Konjugation des Ubiquitins vom E2 auf das Substrat-Protein koordinieren. Beispiele für solche großen Multiproteinkomplexe sind CRL (Cullin RING Ubiquitin Ligase) Komplexe wie z.B. SCF (Skp1, Cullin, F-box) Komplexe [31] (Abbildung 2).

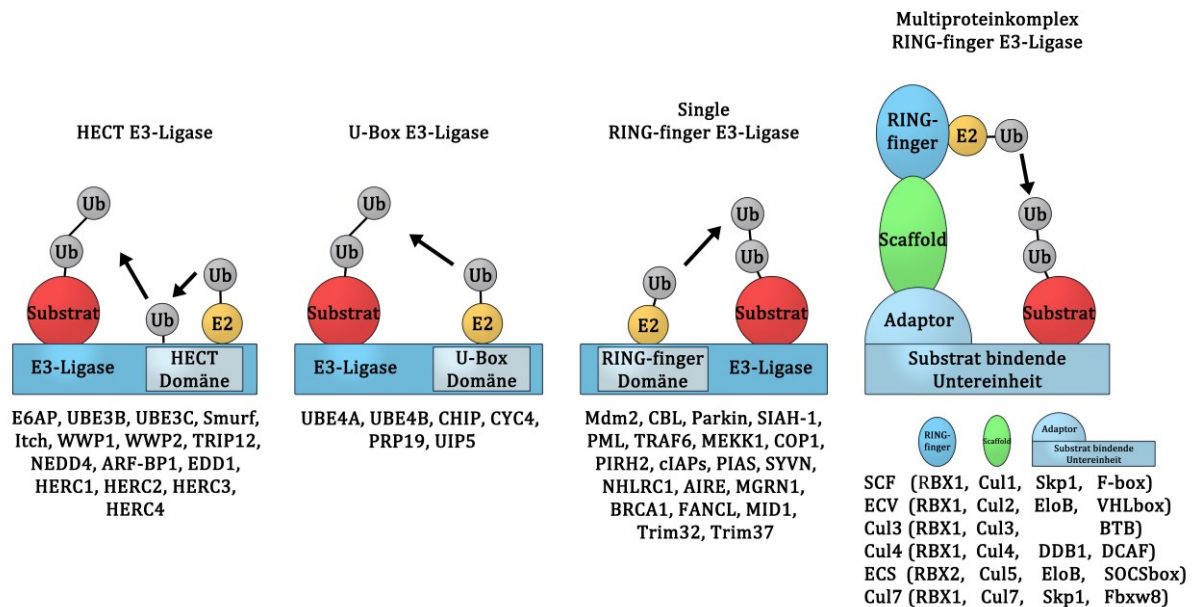


Abbildung 2: E3-Ubiquitin-Ligase Typen. Allgemein werden HECT und RING-finger E3-Ubiquitin-Ligasen unterschieden. HECT Proteine akzeptieren Ubiquitin von einem assoziierten E2 Enzym und konjugieren das Ubiquitin anschließend auf das Substrat-Protein. RING-finger E3s übertragen das Ubiquitin indirekt über ein gebundenes E2 Enzym. U-Box E3-Ubiquitin-Ligasen sind mechanistisch betrachtet RING-finger ähnliche E3-Ubiquitin-Ligasen. Die Familie der RING-finger E3-Proteine wird unterteilt in Single und Multiproteinkomplex E3-Ubiquitin-Ligasen. Abbildung modifiziert nach KEGG pathway „Ubiquitin mediated proteolysis“ [26, 27].

1.4 Muscle RING-Finger Proteine (MuRFs)

Die Substrat-Spezifität des UPS in Skelett- und Herzmuskelgewebe wird u.a. durch drei Proteine der *Muscle RING-finger* (MuRF) Familie (MuRF1, 2 und 3) und dem F-Box Substrat-Adapter-Protein Atrogin-1/MAFbx (*FBXO32*) gewährleistet. Die MuRF-Proteine sind RING-finger E3-Ubiquitin-Ligasen, welche die Ubiquitin-Konjugation indirekt über ein interagierendes und Ubiquitin beladenes E2 Enzym dirigieren. Alle MuRF-Proteine werden spezifisch im Skelett- und Herzmuskelgewebe sowie in verschiedenen anderen muskelabgeleiteten Geweben, wie z.B. der Iris oder auch der Zunge höherer Tiere hergestellt [32]. Die Synthese eines der MuRF-Proteine (MuRF1) ist unter Muskelatrophie stark erhöht [17] und es konnte gezeigt werden, dass MuRF1 am Abbau von Muskelmasse in vielen Atrophie-Modellen von entscheidender Bedeutung ist (Abschnitt 1.5).

MuRF-Proteine weisen im N-terminalen Bereich einen hohen und im C-terminalen Bereich einen geringeren Konservierungsgrad auf. Die MuRF-Proteine gehören zur Familie der N-terminalen RING-finger B-box Coiled-coil (RBCC) oder auch TRIM (*tripartite motif*) genannten Protein-Familie [33]. Die N-terminale RING-finger Domäne

(Cys3HisCys4 Motiv) beinhaltet die für die E3-Ubiquitin-Ligase wichtige Ubiquitinierungsaktivität, die Funktion der B-Box Domäne wurde bisher nicht charakterisiert und die zwei Coiled-coil (Cc) Domänen sind an der Homo- und Heterodimerisierung bzw. -oligomerisierung der Proteine beteiligt [32, 34]. Des Weiteren besitzen alle MuRF-Proteine eine sogenannte *MuRF-family conserved* Domäne (MFCD), ein C-terminal an den RING-finger angeschlossener Bereich der nahezu in allen Familienmitgliedern identisch, also hoch konserviert ist (Abbildung 3).

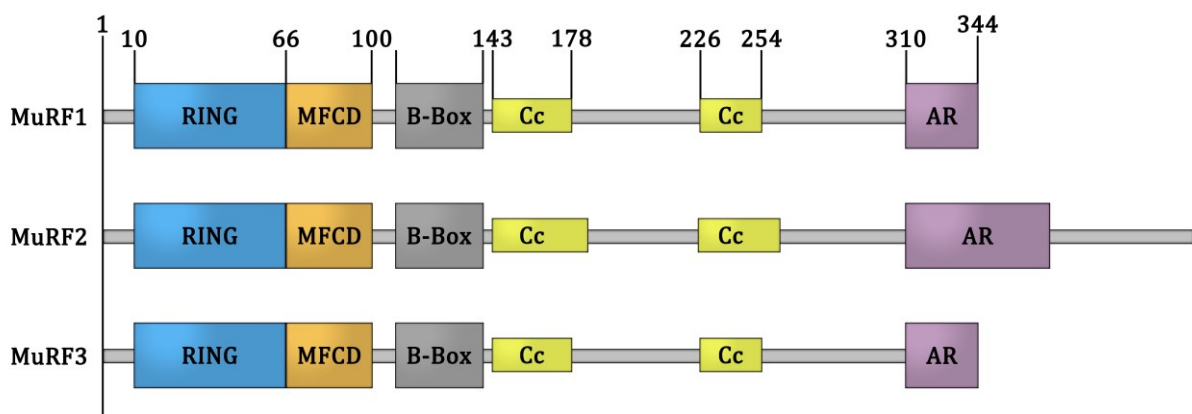


Abbildung 3: Domänenstruktur der MuRF-Proteine. Aufbau der MuRF-Domänenstruktur aus N-terminaler RING-, MFCD-, B-Box- und zwei Cc-Domänen sowie C-terminalen aziden Regionen (AR). Weitere Abkürzungen im Text.

In Muskelzellen sind MuRF-Proteine an verschiedenen Strukturen des Sarkomers sowie mit Mikrotubuli assoziiert. MuRF1 zeigt diffuse Lokalisationen im Zytosol, ist des Weiteren an der Z-Scheibe sowie im Bereich der M-Bande lokalisiert [34, 35] und kann durch atrophische Stimuli in den Zellkern transportiert werden [36, 37]. MuRF2 und MuRF3 interagieren *in vitro* mit stabilem glutamyliertem Tubulin bzw. Mikrotubuli [32, 36, 38]. Zusätzlich konnte GFP markiertes und in Muskelzellen transfiziertes MuRF1, ebenfalls im Zytosol, teilweise an der M-Linie und in kleinen punktierten Strukturen bzw. Aggregaten verschiedenster Größe beobachtet werden, die höchstwahrscheinlich durch Homooligomerisierungen entstehen [35]. Die Hauptfunktion der MuRF-Proteine ist dessen Rolle im Ubiquitin vermittelten Abbau von muskelspezifischen Proteinen. Bisher wurden nur einige wenige Substrat-Proteine der MuRFs wie z.B. Filamin c (FLNc), *four and a half LIM domain 2* (FHL2), β /*slow Myosin heavy chain* (β /*slow* MHC), Creatin-Kinase (CK), Aktin und Troponin I (TnI) identifiziert [39-42]. Allerdings konnte nur für wenige dieser Proteine (β /*slow* MHC [42] und Aktin [43]) eine zweifelsfreie zielgerichtete Ubiquitinierung im zellfreien System gezeigt werden. Zusätzlich konnten in vorangegangenen Studien einige andere MuRF-Interaktionspartner identifiziert, jedoch

größtenteils nicht detailgerecht validiert und charakterisiert werden. MuRF1 interagiert beispielsweise mit *muscle creatine kinase* (M-CK) [44], Myotilin (MYOT), Nebulin (NEB), *Nebulin-related anchoring protein* (NRAP), Telethonin (TCAP), Troponin I (TNNI2) und Troponin T (TNNI3) (alle durch Witt et al. (2005) identifiziert [45]). Des Weiteren interagiert MuRF1 mit *glucocorticoid modulatory element binding protein 1* (GMEB1) [35], *ubiquitin-conjugating enzyme E2I* (UBE2I) [35], *ubiquitin specific peptidase 13* (USP13) [35]; Sequestosome-1 (SQSTM1) [37], *serum response factor* (SRF) [37] sowie mit *polyubiquitin-C* (UBC) [46] und *alpha 1 actin* (ACTA1) [43]. Insgesamt sind in der online Datenbank BioGRID^{3.2} (<http://thebiogrid.org/>) für hsMuRF1 (Trim63) 90, für hsMuRF2 (Trim55) 56 und für hsMuRF3 (Trim54) 31 interagierende Proteine hinterlegt.

In Experimenten mit *MuRF1* Knockout- (KO) Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von MuRF1 weder einen entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung noch auf die Physiologie der Tiere unter basalen Bedingungen hat [47]. Des Weiteren zeigten *MuRF1* KO-Mäuse keine Veränderungen im Wachstumsverlauf und die Morphologie sowie Gewicht der Skelett- und Herzmuskulatur verglichen mit Wildtyp-Mäusen war normal. Nach Denervations-induzierter Skelettmuskelatrophie konnte jedoch gezeigt werden, dass *MuRF1* KO-Mäuse eine Skelettmuskelatrophie-Resistenz ausbilden [47]. Dieser Phänotyp bestätigte sich in vielen anderen Atrophie-Modellen [17]. *MuRF2* und *MuRF3* Einzel KO-Mäuse zeigten ebenfalls unter basalen Bedingungen keine besonderen Auffälligkeiten [48]. Die *MuRF3* Einzel KO-Mäuse waren jedoch nach akutem Myokardinfarkt anfälliger für kardiale Ruptur (Zerreißen des Herzmuskels) [39]. Dem hingegen entwickeln *MuRF1/MuRF2* Doppel-Knockout- (dKO) Mäuse unter basalen Bedingungen Kardiale- sowie Skelettmuskel-Hypertrophien [49]. Außerdem weisen *MuRF1/MuRF3* dKO-Mäuse eine Skelettmuskel-Myopathie sowie hypertrophe Kardiomyopathie charakterisiert durch MHC Akkumulierung und verminderte Muskelkraft auf [42]. Die Charakterisierung von *MuRF2/MuRF3* dKO-Mäusen sowie tripple KO-Mäusen aller MuRFs ist Gegenstand aktueller Forschungsarbeiten, dessen Auswertung neue Erkenntnisse zum Verständnis der MuRF-Proteine beitragen wird. Aufgrund der Tatsache, dass die MuRF-Proteine in der Lage sind Homo- und Heterodimere sowie -oligomere zu bilden und MuRF Einzel KO-Mäuse keine drastischen Phänotypen im Vergleich zu krankhaften dKO-Mäusen aufweisen, wird vermutet, dass

die MuRF-Proteine redundant fungieren. Fehlt eines der Proteine, wird dessen Verlust durch die Aktivierung eines anderen MuRF-Proteins kompensiert [50].

1.5 Involvierung der MuRFs in Muskelkrankheiten

Abnormalitäten oder Fehlfunktionen des UPS in der quergestreiften Muskulatur werden mit unterschiedlichen Muskelkrankheiten (Myopathien) in Verbindung gebracht [3]. Obwohl das UPS und die MuRFs (insbesondere MuRF1) bisher hauptsächlich mit einer Aktivierung innerhalb verschiedener Atrophie-Modelle [17] in Verbindung gebracht wurden, deuten neuere Studien auch auf eine Aktivierung des UPS und MuRF1 in kardialen Hypertrophie-Modellen hin [48].

Skelettmuskelatrophie resultiert aus einem Ungleichgewicht zwischen Proteinsynthese und Proteinabbau. So führt der übermäßige Abbau von strukturellen Proteinen wie z.B. Aktin und Myosin sowie Sarkomer assoziierten Proteinen zum Verlust von Muskelmasse und damit einhergehend zu einer Verringerung der Muskelkraft. Skelettmuskelatrophie wird häufig durch Inaktivität wie beispielsweise durch Bettlägerigkeit oder Immobilisation, durch Denervierung des Muskels (z.B. Rückenmarksverletzungen, Schlaganfall, Nervenkrankungen) und altersbedingte Sarkopenie ausgelöst. Außerdem tritt Skelettmuskelatrophie als Folge von sehr starker Abmagerung (Kachexie) in diversen teilweise lebensbedrohlichen chronischen Krankheiten wie Krebs (Tumorkachexie), rheumatoide Arthritis (rheumatoide Kachexie), Diabetes, AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*, dt. erworbenes Immundefektsyndrom), Nierenversagen und COPD (*chronic obstructive pulmonary disease*, dt. chronisch obstruktive Lungenerkrankung) auf, welche sich negativ auf die Pathogenese, Lebensqualität und Prognose auswirkt [17]. In vielen unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass *MuRF1* in nahezu allen Muskelatrophie-Modellen (Herz- und Skelettmuskel) sowohl *in vitro* (verschiedene Zellkultur-Modelle) als auch *in vivo* (diverse Mausmodelle) verstärkt exprimiert wird und für die Entstehung der Atrophie von entscheidender Bedeutung ist [16, 17, 47, 51-53]. Als Konsequenz der erhöhten Expression ist *MuRF1* in der Muskelatrophie im verstärkten Maße am UPS vermittelten Proteinabbau durch die Ubiquitinierung von muskulären Proteinen, welche anschließend durch das 26S-Proteasom degradiert werden, beteiligt. In der Atrophie ubiquitiniert MuRF1 verstärkt *Myosin-binding protein C* (MBP-C), *Myosin heavy chain*

(MHC) und *Myosin light chain-1, -2* (MLC-1, -2) sowie *Muscle-type creatine kinase* (M-CK) Proteine und initiiert damit dessen UPS-abhängigen Abbau [44, 52]. Dies führt zu einem Verlust von Muskelmasse und einer damit verbundenen Reduktion von physischer Stärke. Die Hemmung von MuRF1 durch Herunterregulation der Genexpression, Deletion des MuRF1 Gens (*Trim63*) oder Inaktivierung der für die Ubiquitinierung benötigten RING-finger Domäne (Deletion oder Mutierung) führt zu einer Atrophie-Resistenz [17, 47, 51-53]. Aufgrund der Schlüsselrolle von MuRF1 in der Muskelatrophie, wird angenommen, dass die Hemmung von MuRF1 zur Prävention und Reversion von Muskelatrophien eingesetzt werden könnte. In einer Studie von 2011 [54] konnte erstmals gezeigt werden, dass die spezifische Inhibierung der MuRF1 Aktivität durch P013222, eine niedermolekulare Verbindung (*small molecule*), Skelettmuskelatrophie vermindern kann.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

MuRF-Proteine sind RING-finger E3-Ubiquitin-Ligasen, die in der quergestreiften Muskulatur den UPS-abhängigen Abbau von muskulären Proteinen koordinieren. Obwohl bekannt ist, dass viele E3-Ubiquitin-Ligasen in Multiproteinkomplexen agieren, konnte dies bisher nicht für MuRF-Proteine nachgewiesen werden. Zur weiteren Charakterisierung der MuRF-Proteine sollten in dieser Arbeit neue Interaktionspartner bzw. Komponenten putativer Multiproteinkomplexe identifiziert werden. Um dieses Ziel zu erreichen, sollten zwei methodisch unterschiedliche, aber sich ergänzende Screening-Techniken angewandt werden: 1. Hochdurchsatz Hefe-Zwei-Hybrid-Screens (*Yeast Two-Hybrid*, Y2H) und 2. SILAC-AP-MS (*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture-affinity purification-mass spectrometry*) Experimente. Ein zentraler Aspekt dieser Arbeit war es die mit beiden Techniken gewonnen Datensätze miteinander zu vergleichen. Proteine, die mit beiden Methoden identifiziert würden, sollten mit einer höheren Wahrscheinlichkeit physiologische MuRF-Interaktionspartner darstellen. Anschließend sollten ausgewählte MuRF-Interaktionen durch weitere Methoden wie beispielsweise Ko-Immunpräzipitationen (Ko-IP) und Kolokalisationsstudien bestätigt werden. Fokus sollte hierbei auf Proteine, die potentiell Teil eines putativen MuRF-Multiproteinkomplexes wie z.B. komplex koordinierende Scaffolding-Proteine, E2 Enzyme, Substrat-Proteine, Substrat-Adapter-Proteine, deubiquitinierende Proteine (DUBs) und MuRF-Aktivität-modulierende Proteine (z.B. Kinasen) gelegt werden. Im

Anschluss an die Interaktionsbestätigung sollten die vielversprechendsten neuen MuRF-Interaktionen sowohl unter basalen als auch MuRF relevanten pathologischen Zuständen mittels individuell designter Versuche charakterisiert werden. Hierbei sollten insbesondere Interaktionspartner charakterisiert werden, die einen Einfluss auf die MuRF1 abhängige Entwicklung von Skelettmuskelatrophie haben.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden hauptsächlich von den Firmen BD Biosciences, Fluka, Invitrogen, Merck, Roche, Roth, Serva und Sigma-Aldrich bezogen und lagen in Analysequalität vor. Des Weiteren wurden Restriktionsenzyme von New England Biolabs (NEB) bezogen, Oligonukleotide von BioTeZ, Feinchemikalien für die Elektrophorese von Bio-Rad sowie Zellkulturmedien und Zusätze von PAA bzw. GE Healthcare. Für das Ansetzen von Lösungen wurde steriles Reinstwasser (Millipore-Qualität) oder doppelt destilliertes Wasser (ddH₂O) verwendet. Alle weiteren Angaben zu den verwendeten Verbrauchsmaterialien finden sich im Text.

2.1.2 Geräte

Tabelle 1: Geräte. Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte, deren Bezeichnung und Hersteller.

Gerät	Name	Hersteller
Brutschrank	B 500	Memmert
Inkubationsschüttler	Innova 44	New Brunswick Scientific
CO ₂ Brutschrank	CB 210	BINDER
Tischzentrifuge	3K12	Sigma
Tischzentrifuge	<i>Centrifuge 5424 R</i>	Eppendorf
Tisch-Kühlzentrifuge	<i>Centrifuge 5417R</i>	Eppendorf
Kühlzentrifuge	4K15	Sigma
Ultrazentrifuge	<i>Optima MAX-XP</i>	Beckman Coulter
PCR-Maschine	Primus 25	peQLab
Elektroporationsgerät	<i>Gene Pulser</i>	BioRad
Gel-Dokumentation	UV-Transilluminator Gel-Doc	peQLab
UV-Vis Spektralphotometer	<i>NanoDrop 2000</i>	Thermo Fisher Scientific
Spektrrophotometer	<i>Ultrospec 3100 pro</i>	Amersham Bioscience
Elektrophorese Netzteil	<i>Power Pac 300</i>	BioRad
Agarose-Elektrophorese	<i>Unit HE 33</i>	Hoefer
Protein-Elektrophorese	<i>Electrophoresis Mighty Small II</i>	Hoefer
Protein-Transfer	<i>Mighty Small Transfer Tank TE 22</i>	Hoefer
Röntgenfilmentwicklungsmaschine	<i>Fuji X-Ray Film Processor RGII</i>	Fuji
Vakuumtrockner	<i>Gel dryer Model 583</i>	Bio-Rad

Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Thermomixer	Compact	Eppendorf
Magnetrührer	IKamag RCT	IKA
pH-Meter	pH-Meter	Schott
Wasserbad	Fisons	HAAKE
Wasserbad	1002	GFL
Sterile Werkbank	UVF 6.12 S	BDK
Durchlichtmikroskop	CK2	Olympus
Fluoreszenzmikroskop	Axio Observer Z1 inverse	Zeiss
Bildbearbeitungssoftware	AxioVision LE	Zeiss
Bildbearbeitungssoftware	Adobe Photoshop CS5	Adobe Systems
Massenspektrometer	LTQ Orbitrap XL	Thermo Fisher Scientific
Massenspektrometer	Q Exactive	Thermo Fisher Scientific

2.1.3 Bakterienstämme

Tabelle 2: Bakterienstämme

Stamm	Anwendungsgebiete und Genotyp	Herkunft
XL-1-Blue	Klonierungsstamm <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proA B lacI^q ΔM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Agilent
DH5α-T1 ^R	Gateway Klonierungsstamm F ⁻ <i>φ80lacΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1</i> <i>hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA1</i>	Invitrogen
BL21-Rosetta (DE3)	Synthese rekombinanter Proteine (GST-Tag, MBP-Tag) F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm pRARE² (Cam^R)</i>	Novagen
M15[pREP4]	Synthese rekombinanter Proteine (His-Tag) NaI ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺	QIAGEN

2.1.4 Zelllinien

Tabelle 3: Zelllinien

Name	Eigenschaften	Ursprungsspezies	Ursprungsgewebe	Herkunft
COS-7	Fibroblasten	<i>Cercopithecus aethiops</i> , Affe	Niere	ATCC CRL-1651
C2C12	Myoblasten	<i>Mus musculus</i> , Maus	Skelettmuskel	ATCC CRL-1772
H9c2(2-1)	Myoblasten	<i>Rattus norvegicus</i> , Ratte	Herzmuskel	ATCC CRL-1446

16 Material und Methoden

2.1.5 Adenoviren

Tabelle 4: Adenoviren. Die verwendeten Adenoviren (AdV) für die Transduktion bzw. Expression in H9c2-Zellen wurden von der Firma SIRION BIOTECH GmbH (Martinsried) hergestellt. Angegeben ist die Bezeichnung der Viren, der Virus-Titer und der in den Experimenten verwendete MOI (*Multiplicity of infection*, dt. Multiplizität der Infektion). Die Einheit MOI gibt die Menge an infektiösen Viruspartikeln pro Zelle an. Abk. AdV-PL: AdV-Promoter-Less, dt. adenoviraler Kontrollvirus ohne Promoter

Bezeichnung	Titer [PFU/ml]	Viren/Zelle [MOI]	Anmerkung
AdV-MuRF1	1×10^{10}	200	C-terminaler Myc-/6xHis-Tag
AdV-MuRF2	3×10^9	200	C-terminaler Myc-/6xHis-Tag
AdV-MuRF3	1×10^{10}	200	C-terminaler Myc-/6xHis-Tag
AdV-PL	$1,6 \times 10^{10}$	200	Promoter-Less (Kontrollvirus)
AdV-GFP	5×10^9	200	GFP-Tag

2.1.6 Plasmide

Tabelle 5: Plasmide. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide, deren Anwendungen, Eigenschaften sowie Herkunft.

Plasmid	Anwendung / Eigenschaften	Herkunft
pGEM-T	T/A-Klonierung	Promega
pZsGreen1-C1	eukaryotische Expression, N-terminaler GFP-Tag	Clontech
pZsGreen1-N1	eukaryotische Expression, C-terminaler GFP-Tag	Clontech
pMCherry-C1	eukaryotische Expression, N-terminaler RFP-Tag	Clontech
pmCherry-N1	eukaryotische Expression, C-terminaler RFP-Tag	Clontech
pcDNA3.1(-)	eukaryotische Expression, C-terminaler Myc-/6xHis-Tag	Invitrogen
pcDNA3.1(-)FLAG	eukaryotische Expression, C-terminaler FLAG-Tag	Invitrogen
pDONR221	Gateway Donor-Vektor	Invitrogen
pFLAG-CMV-D11	eukaryotische Expression, Gateway Destination-Vektor, FLAG-Tag	Invitrogen
pGEX-6P-1	prokaryotische Expression, N-terminaler GST-Tag, PreScission	GE Healthcare
pMAL-c2x	prokaryotische Expression, N-terminaler MBP-Tag, Factor Xa	NEB
pMAL-c4e	prokaryotische Expression, N-terminaler MBP-Tag, Enterokinase	NEB
pQE30	prokaryotische Expression, N-terminaler 6xHis-Tag	QIAGEN
pQE60	prokaryotische Expression, C-terminaler 6xHis-Tag	QIAGEN

2.1.7 Oligonukleotide

Tabelle 6: Oligonukleotide. Aufgelistet sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Nummer	Oligonukleotid-Name	Sequenz [5' nach 3']
001F	ZsG-C-M1-f	CGGGGTACCGATTATAAATCTAGCCTGATTC
001R	ZsG-C-M1-r	CGCGGATCCTCATTGGTGTTCTTCTTTAC
002F	ZsG-N-M1-f	CCGCTCGAGATGGATTATAAATCTAGCCTG
002R	ZsG-N-M1-r	CCCAAGCTTTTGTTGTTCTTCTTTACCCTC
003R	ZsG-C-M2-r	CGGGGTACCTTATTCATTTAGGGAATTCAAC
003F	ZsG-C-M2-f	GGAAGATCTAGCACTTCTCTGAATTACAAG
004R	ZsG-N-M2-r	CCCAAGCTTTTCATTTAGGGAATTCAACC
004F	ZsG-N-M2-f	CCGCTCGAGATGAGCACTTCTCTGAATTAC
005F	mC-C-M3-f	CGGGGTACCAACTTCACGGTGGGTTTCAAG

005R	mC-C-M3-r	CGCGGATCCTCAGTGCAGGCCTGAGCCTTC
006R	mC-N-M3-r	CCCAAGCTTGTGCAGGCCTGAGCCTTCTG
006F	mC-N-M3-f	CCGCTCGAGATGAACTTCACGGTGGGTTTC
007F	Seq_Prim_ZsG-C-f	GTACCTGCTGCTGAAGGACGG
007R	Seq_Prim_ZsG-C-r	CAAAATATTAACGCTTACAATTTACGCG
008F	Seq_Prim_ZsG-N-f	TGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTC
008R	Seq_Prim_ZsG-N-r	CGGCGCCGTCTCTGAACAGG
009F	Seq_Prim_mC-C-f	GCTGAAGCTGAAGGACGGCGG
009R	Seq_Prim_mC-C-r	CAAAATATTAACGCTTACAATTTACGCG
010F	Seq_Prim_mC-N-f	TGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTC
010R	Seq_Prim_mC-N-r	CGTACATGAACTGAGGGGACAGG
011F	Seq pFLAG-CMV-D11-f	GGAGGTCTATATAAGCAGAGCTC
011R	Seq pFLAG-CMV-D11-r	CGGGATCCTCTAGAGTCGACTG
012F	pQE30-DCAF8-f	CGCGGATCCTCCAGCAAAGGGAGCAGCAC
012R	pQE30-DCAF8-r	CGGGGTACCTCAAGATGGCATGCACTGCAC
013F	pGEX-6P-1-DCAF8-f	CGCGGATCCTCCAGCAAAGGGAGCAGCAC
013R	pGEX-6P-1-DCAF8-r	CCGCTCGAGTCAAGATGGCATGCACTGCAC
014F	pXFP-C-DCAF8-f	CGGGGTACCTCCAGCAAAGGGAGCAGCAC
014R	pXFP-C-DCAF8-r	CGCGGATCCTCAAGATGGCATGCACTGCAC
015F	pXFP-N-DCAF8-f	CCGCTCGAGATGTCCAGCAAAGGGAGCAG
015R	pXFP-N-DCAF8-r	TCCCCGCGGAGATGGCATGCACTGCAC
016F	T7 Promoter	TAATACGACTCACTATAGGG
016R	BGH Reverse	TAGAAGGCACAGTCGAGG
017F	pQE60-DCAF8-f	CATGCCATGGATGTCCAGCAAAGGGAGCAG
017R	pQE60-DCAF8-r	CGCGGATCCAGATGGCATGCACTGCAC
018F	pMAL-c2x-DCAF8-f	CCGGAATTCTCCAGCAAAGGGAGCAGCAC
018R	pMAL-c2x-DCAF8-r	CCGCGGCCGCTATGGCCAAGACGTCGACTC-
018R	Fortsetzung	-AAGATGGCATGCACTGCAC
019F	Seq_pMAL-c4e-f	GGTCGTCAGACTGTTCGATGAAGCC
019R	Seq_pMAL-c4e-r	CAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTG
020F	Seq_DCAF8-middle-f	CAGCGCGGCACCTGGCTGGCCAGTGG
021F	pGEX-6P-1-MYLK2-f	CGCGGATCCGCGACAGAAAATGGAGCAGTTG
021R	pGEX-6P-1-MYLK2-r	CCGCTCGAGTCAGACCCCAGAGCCATCAGTGC
022F	pGEX-6P-1-MuRF1-f	CGCGGATCCGATTATAAATCTAGCCTGATTC
022R	pGEX-6P-1-MuRF1-r	CCGCTCGAGTCATTGGTGTTCTTCTTTACC
023F	pGEX-6P-1-MuRF3-f	CGCGGATCCAACTTCACGGTGGGTTTCAAG
023R	pGEX-6P-1-MuRF3-r	CCGCTCGAGTCAGTGCAGGCCTGAGCCTTC
024F	pcDNA_3.1(-)A-DCAF8-f	CCGGAATCCATGTCCAGCAAAGGGAGCAGCACAG
024R	pcDNA_3.1(-)A-DCAF8-r	CGGGGTACCAGATGGCATGCACTGCACCCGGTC
025F	pcDNA_3.1(-)A-DCAF8-EcoRV-f	CCGGATATCATGTCCAGCAAAGGGAGCAGCACAG
026F	pcDNA_3.1(-)A-DCAF8-EcoRI-f	CCGGAATTCATGTCCAGCAAAGGGAGCAGCACAG

2.1.8 siRNAs

Tabelle 7: siRNAs. Aufgelistet sind die verwendeten siRNAs (Dharmacon bzw. Thermo Fisher Scientific), deren Bezeichnung und Sequenzen.

siRNA Bezeichnung	Sequenzen [5' nach 3']	Anwendung
siRNA-DCAF8 (WDR42A) (ON-TARGETplus SMARTpool)	GAGUUUGUGGUGAGCGGUA GAGUCUUUGUACAGCGUUU CGAAACUAGUGGUGACAAA CCCAGUAUAUUAAGAGUA	Verringerung der endogenen WDR42A Proteinmenge
siRNA-trim63 (MuRF1) (ON-TARGETplus SMARTpool)	CUACUUUACUCUGGACUUA CUUGAGGGCCAUUGACUUU UGCAGACGAUCAUCUCUCA GCUCUGAUCCUCCAGUACA	Verringerung der endogenen MuRF1 Proteinmenge
ON-TARGETplus (Non-targeting Control Pool)	Nicht bekannt	siRNA Negativkontrolle

2.1.9 Kulturmedien

2.1.9.1 Kulturmedien für die Bakterienanzucht

Tabelle 8: Kulturmedien für die Bakterienanzucht. Abk. LB-Medium: *Lysogeny broth* Medium, TB-Medium: *Terrific Broth* Medium, Amp: Ampicillin, Kana: Kanamycin, Chlor: Chloramphenicol, X-Gal: 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid, IPTG: Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid, SOC-Medium: *Super Optimal Broth* (SOB) Medium mit Glukose.

Kulturmedium	Zusätze
LB-Medium	1% (w/v) Bacto-Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 1% (w/v) NaCl pH 7,5
TB-Medium	1,2% (w/v) Bacto-Trypton 2,4% (w/v) Hefeextrakt 0,4% Glycerol 17 mM KH ₂ PO ₄ , 72 mM K ₂ HPO ₄
LB-/TB-Amp-Medium	LB-Medium + 50 μ g/ml Ampicillin
LB-/TB-Kan-Medium	LB-Medium + 25 μ g/ml Kanamycin
LB-/TB-Chlor-Medium	LB-Medium + 68 μ g/ml Chloramphenicol
LB-Agarplatte	LB-Medium + 2% Agar-Agar
X-Gal/IPTG-Agarplatte	LB-Amp Agarplatte + 1 mM IPTG + 400 μ M X-Gal
SOC-Medium	2% (w/v) Bacto-Trypton 0,5% (w/v) Hefeextrakt 0,4% (w/v) D-Glukose 10 mM NaCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ 2,5 mM KCl pH 7,4

2.1.9.2 Zellkulturmedien

Tabelle 9: Zellkulturmedien. Aufgelistet sind die in dieser Arbeit verwendeten Zellkulturmedien. Alle Medien wurden von PAA bezogen, FKS ebenfalls von PAA (A15-151), SILAC-FKS mit einem 10.000er *Molecular Weight Cut-off* von Sigma (F0392) und Antibiotika (Penicillin/Streptomycin) ebenfalls von PAA. Das Vollmedium wurde für die Proliferation aller Zellen (COS-7, C2C12 und H9c2) verwendet, das Differenzierungsmedium zur Differenzierung von C2C12-Zellen und das SILAC-Vollmedium zur Proliferation und SILAC-Markierung von H9c2 Zellen.

Mediums-Bezeichnung	Medium	Serum	Antibiotika
Vollmedium	DMEM (4,5 g/l Glukose) mit Gln	10% FKS	Pen/Strep
Differenzierungsmedium	DMEM (4,5 g/l Glukose) mit Gln	2% FKS	Pen/Strep
SILAC-Vollmedium	SILAC-DMEM (4,5 g/l Glukose) ohne Arg, Lys, Gln	10% SILAC-FKS	Pen/Strep
Kryo-Medium	Vollmedium mit 10% DMSO	10% FKS	Pen/Strep
Kryo-Medium (2)	FKS mit 10% DMSO	FKS	ohne

2.1.10 Antikörper

2.1.10.1 Primäre Antikörper

Tabelle 10: Primäre Antikörper. Aufgelistet sind die verwendeten primären Antikörper, deren Herkunft, die Verdünnung im Experiment und der Hersteller der Antikörper. Primäre Antikörper für die Detektion im Immunblot (IB) wurden in 5% (w/v) Magermilch/TBT angesetzt. Die in der Immunhistochemie (IHC) verwendeten primären Antikörper wurden in PBS mit 5% (v/v) Ziegenserum angesetzt, da die verwendeten Sekundärantikörper in der Ziege hergestellt wurden (siehe Tabelle 11). Abk. PBS: *Phosphate buffered saline*, dt. Phosphatgepufferte Salzlösung.

Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
α -MuRF1	Maus	IB 1:500 IHC 1:50-100	abcam (ab57865)
α -WDR42A	Kaninchen	IB 1:500-1000 IHC 1:50-100	BETHYL (A301-556A)
α -Myc-Tag	Maus	IB 1:1000	Sigma (M5546-5ml)
α -Myc-Tag	Kaninchen	IB 1:500	Millipore (06-549)
α -FLAG-Tag M2	Maus	IB 1:400	Sigma (F3165)
α -FLAG-Tag	Kaninchen	IB 1:500	Cell Signaling (2368)
α -His-Tag	Maus	IB 1:500-1000	QIAGEN (34660)
α -GST-Tag	Ziege	IB 1:500	Rockland
α - β -Aktin	Kaninchen	IB 1:1000	Cell Signaling (4967L)
α -GAPDH	Maus	IB: 1:30.000	Millipore (MAB374)

2.1.10.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 11: Sekundäre Antikörper. Die verwendeten sekundären Antikörper wurden in 5% (w/v) Magermilch/TBT (IB) oder in PBS (IHC) angesetzt. Abkürzungen siehe Tabelle 10.

Bezeichnung	Herkunft	Reaktivität mit	Anwendung	Verdünnung	Hersteller
IgG HRP	Kaninchen	Maus	IB	1:10.000	Sigma (A9044)
IgG HRP	Maus	Kaninchen	IB	1:10.000	Sigma (A0545)
Alexa-Fluor 488	Ziege	Kaninchen	IHC	1:500	Invitrogen (A11001)
Alexa-Fluor 555	Ziege	Maus	IHC	1:500	Invitrogen (A21422)

2.1.11 Fluoreszenzmikroskop Filtersätze

Tabelle 12: Fluoreszenzmikroskop Filtersätze. Die in dieser Arbeit verwendeten Filtersätze (Zeiss) des Fluoreszenzmikroskops *Axio Observer Z1 inverse* (Zeiss). Die von den Filtersätzen durchgelassenen Wellenlängenbereiche sind in Nanometer (nm) angegeben. Abk. BP: Bandpaßfilter und FT: Strahlteiler.

Filtersatz	Anregung	Strahlteiler	Emission
38 Endow GFP shift free (E)	BP 470/40	FT 495	BP 525/50
50 Cy 5 shift free (E)	BP640/30	FT 660	BP 690/50
43 Cy 3, d=25 shift free (E)	BP 545/25	FT 570	BP 605/70
49 DAPI shift free (E)	G 365	FT 395	BP 445/50

2.1.12 Fluoreszenzmikroskop Objektive

Tabelle 13: Fluoreszenzmikroskop Objektive. Die in dieser Arbeit verwendeten Objektive (Zeiss) des Fluoreszenzmikroskops *Axio Observer Z1 inverse* (Zeiss).

Objektiv
EC Plan-NEOFLUAR 10x/0.3 Ph1
LD Plan-NEOFLUAR 20x/0.4 Ph2
LD Plan-NEOFLUAR 40x/0.6 Ph2
EC Plan-NEOFLUAR 100x/1.3 Oil Ph3

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde für die gezielte Amplifikation und Vervielfältigung von definierten DNA-Sequenzen aus cDNA-Banken oder bereits vorhandener Plasmid-DNA verwendet. Für die PCR-DNA-Synthese wurden dem experimentellen Ansatz entsprechend verschiedene Polymerasen verwendet. Für die Amplifikation von DNA-Sequenzen aus bereits klonierten Konstrukten wurde aufgrund der geringen Fehlerrate das *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) verwendet. Außerdem wurde noch die Pfu Ultra™ DNA-Polymerase (Stratagene) und Taq DNA-Polymerase verwendet. Über die verwendeten Oligonukleotide (Tabelle 6) wurden die für die Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen eingeführt. Im Allgemeinen enthielt ein PCR-Ansatz den entsprechenden 1xPCR-Puffer (Expand-, Pfu- oder Taq-Puffer), Desoxyribonukleotide (dNTPs), *forward* und *reverse*-Oligonukleotide, die Matrizen-DNA, die entsprechende Polymerase und ad ddH₂O. Diese PCR-Ansätze wurden anschließend in einem Thermocycler mit dem in der Tabelle 14 dargestelltem Temperaturprofil durchgeführt.

Tabelle 14: Thermocycler-Programm für DNA-Amplifikationen

Zyklusschritt	Temperatur	Dauer	
Initialdenaturierung	95°C	5'	20 Zyklen
Denaturierung	94°C	30"	
Hybridisierung	58°C	1'	
Elongation	72°C	2'	
Finale Elongation	72°C	10'	

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurde ein Teil des PCR-Ansatzes in einem Agarosegel elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Durch einen DNA-Molekularmassenstandard als Referenz wurden die Amplifikate auf ihre korrekte Größe kontrolliert. Anschließend wurden die hergestellten DNA-Sequenzen entweder für eine Klonierung in einem entsprechenden Vektor verwendet oder mittels Sequenzierung auf Fehlerfreiheit der Sequenz überprüft.

2.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente wie z.B. PCR-Produkte, geschnittene oder ungeschnittene Plasmid-DNA der Größe nach aufgetrennt. Durch den gleichzeitigen Vergleich der aufgetrennten DNA mit DNA-Strängen bekannter Größe (Größenstandards bzw. DNA-Marker) konnte die Größe der untersuchten DNA-Fragmente eingeschätzt werden. Als Größenstandard wurde ein 1 Kb DNA Ladder (Invitrogen) verwendet. Die benutzten Agarosegele enthielten 0,5-2% (w/v) Agarose in 1x TAE-Puffer (50x TAE Puffer: 2M Tris-HCl, 7,2% (v/v) Essigsäure, 50 mM EDTA, pH 8,2), versetzt mit dem Fluorophor *RedSafe*TM (iNtRON Biotechnology, Inc), welches doppelsträngige DNA bindet. Die zu untersuchende DNA wurde mit DNA-Probenpuffer (50% (v/v) Glycerin, 5 mM EDTA, 1,25% (w/v) OrangeG) versetzt und die Elektrophorese bei 100 V in TAE-Puffer durchgeführt. Die auf diese Weise aufgetrennten und *RedSafe*TM inkorporierten DNA-Fragmente wurden mittels UV-Transilluminator im Gel sichtbar gemacht. Diese mit UV-Licht detektierten DNA-Fragmente wurden einerseits dokumentiert (Gel-Doc, PeQLab) und/oder andererseits auf einem UV-Tisch ausgeschnitten und anschließend mittels des *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt.

2.2.1.3 Restriktionsverdau

Die aufgeführten Restriktionsverdau wurden mit Enzymen und Puffern der Firma New England Biolabs (NEB) durchgeführt. Präparative Restriktionsverdau wurden mit PCR

amplifizierten DNA-Sequenzen und zirkulären Vektoren zur Vorbereitung von Klonierungen durchgeführt. Ein präparativer 50 µl Ansatz enthielt in der Regel 5-10 µl PCR-Produkt oder 5-10 µg Vektor-DNA, die vom Hersteller empfohlenen Mengen Restriktionsenzyme und Puffer sowie falls notwendig BSA (*Bovine Serum Albumin*, Rinderserumalbumin) und ad ddH₂O. Solche präparativen Restriktionsverdau-Ansätze wurden 2-4 h lang bei 37°C inkubiert, die geschnittene DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, aus dem Gel extrahiert und aufgereinigt. Nach erfolgreicher Klonierung wurden aus den generierten Konstrukten mittels analytischer Restriktionsverdau die einklonierten DNA-Sequenzen (Inserts) herausgeschnitten und auf die korrekte Größe mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Ein solcher analytischer Restriktionsverdau enthielt 1-2 µg Plasmid-DNA und wurde mit den entsprechenden Enzymen und Puffern für mindestens 1 h bei 37°C inkubiert.

2.2.1.4 Ligation

Nach der Erzeugung kohäsiver Enden von Insert- und Vektor-DNA mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen (z.B. *EcoRI* und *XhoI*), wurden die beiden DNA-Fragmente mittels T4 DNA-Ligase (NEB) miteinander ligiert. Ein Ligationsansatz (10 oder 20 µl) enthielt zumeist 100 ng Vektor-DNA, den dreifachen molaren Überschuss Insert-DNA, die T4 DNA-Ligase und 1x Ligase-Puffer. Dieser Ansatz wurde entweder für 1 h bei Raumtemperatur (RT) oder über Nacht (ÜN) bei 16°C inkubiert und anschließend 1-2 µl in *E. coli* transformiert (Abschnitt 2.2.1.5).

2.2.1.5 Transformation von *E. coli*

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA in *E. coli* Bakterien wurde die verwendete DNA zunächst mittels Elektroporation in entsprechend transformationskompetente *E. coli* (Tabelle 2) transformiert. Ein Transformationsansatz enthielt 50 µl elektrokompente *E. coli* und 0,1-1 µg DNA (bei Re-transformationen) oder 2-10 µl Ligationsansatz (bei Klonierungen). Dieser auf Eis gekühlte Ansatz wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt, diese in die Elektroporationskammer des Elektroporators überführt und bei 2,5 kV und 25 µF in Bakterien transformiert. Nach dem Impuls wurden die transformierten Zellen zur Regeneration zügig mit 500 µl SOC-Medium (Tabelle 8) versetzt und im Thermoschüttler bei 37°C und 750 rpm für 1 h inkubiert. Je nach Ansatz wurden unterschiedliche Mengen der Transformation auf LB-

Agarplatten mit entsprechendem Selektionsdruck ausgestrichen und über Nacht inkubiert.

2.2.1.6 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Aufreinigung von in *E. coli* vermehrter Plasmid-DNA im Mini- und Maxi-Maßstab wurde das *JETstar* System (GENOMED) verwendet (Tabelle 15).

Tabelle 15: *JETstar* System Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
E1 Zellsuspensionspuffer	50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA und Rnase (pH 8)
E2 Zellysepuffer	200 mM NaOH, 1.0% SDS (w/v)
E3 Neutralisationspuffer	3,1 M KOAc, 11,5 % (v/v) Essigsäure (pH 5,5)

Im Mini-Maßstab wurden i.d.R. 5 ml LB-/TB-Kulturmedium mit entsprechendem Selektionsdruck (Amp, Kana und/oder Chlor; Tabelle 8) mit einer Kolonie transformierter Bakterien angeimpft und über Nacht in einem Inkubationsschüttler bei 37°C und 200 rpm vermehrt. Anschließend wurden 2 ml der Übernachtskultur (ÜNK) in einer Tischzentrifuge bei 16.000 rpm für 1 min pelletiert, der Mediums-Überstand verworfen und die pelletierten Bakterien in 150 µl kaltem E1-Zellsuspensionspuffer gelöst. Daraufhin wurden die *E. coli*-Zellen mit 150 µl E2-Zellysepuffer aufgeschlossen und die Lyse nach ca. 2 min Inkubation durch den E3-Neutralisationspuffer terminiert. Durch einen Zentrifugationsschritt bei 16.000 rpm für 10 min wurde die aufgeschlossene Zellsuspension pelletiert und die im Überstand enthaltene DNA in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die im Überstand enthaltene DNA mit 1 ml Ethanol (99%) gefällt, bei 16.000 rpm pelletiert und der Überstand verworfen. Das DNA-Pellet wurde anschließend mit 70% Ethanol gewaschen, erneut pelletiert, der Überstand verworfen und das Restethanol entfernt. Die DNA wurde letztendlich in 50 µl ddH₂O aufgenommen und die Konzentration und Reinheit mittels eines UV-Vis Spektralphotometer (NanoDrop 2000) bei 260/280 nm bestimmt. Bei DNA-Isolierungen im präparativen Maßstab (Maxi-Präp) wurde nach dem gleichen Protokoll mit höheren Volumina nach Herstellerangaben verfahren.

2.2.1.7 Gateway-Klonierungen

Mithilfe der Gateway-Klonierungsmethode (Invitrogen) können durch homologe Rekombination DNA-Sequenzen (bzw. GOIs) sehr effizient von einem Ausgangsvektor (*Entry*-Vektor) in einen Zielvektor (*Destination*-Vektor) überführt werden. Die in den

Gateway *Entry*-Vektor pDONR221 klonierten Y2H-Klone (Tabelle 28) wurden mit dem Gateway System in einer sogenannten LR-Reaktion in den *Destination*-Vektor pFLAG-CMV-D11 zwecks eukaryotischer Expression in COS-7 Zellen kloniert. Eine 10 µl LR-Reaktion enthielt 50-150 ng *Entry*-Vektor, 150 ng *Destination*-Vektor, 2 µl LR-Clonase™ II Enzym-Mix und ad ddH₂O. Der verwendete Gateway LR-Clonase™ II Enzym-Mix besteht aus einer Mischung aus Int (Integrase), IHF (*Integration Host Factor*) und Xis (*Excisionase*) Enzymen, die die *in vitro* Rekombination zwischen dem *Entry*-Klon (enthält das GOI) und dem *Destination*-Vektor katalysieren. Dieser 10 µl LR-Reaktion Ansatz wurde für 1 h bei 25°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 1 µl Proteinase K gestoppt und anschließend in DH5α-T1^R *E. coli* transformiert und mit Ampicillin selektiert.

2.2.1.8 DNA-Sequenzierungen

Um PCR-Fragmente und in Vektoren klonierte Gene auf eingebrachte Fehler bzw. vorhandene Mutationen zu überprüfen, wurden diese durch einen kommerziellen Anbieter sequenziert. Vor der Sequenzierung wurde die zu analysierende DNA durch das Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) gereinigt und anschließend durch die Firma Stratec (ehemals Invitex, Berlin) sequenziert. Daraufhin wurden die ermittelten Sequenzen mit dem Programm ApE und der in verschiedenen Datenbanken (Ncbi Gene oder UniProt) hinterlegten Originalsequenzen durch eine DNA Alignment miteinander verglichen und somit auf Fehlerfreiheit überprüft.

2.2.2 Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente

Die dargestellten Y2H-Experimente wurden von der AG „Proteomforschung und molekulare Mechanismen bei neurodegenerativen Erkrankungen (kurz Neuroproteomics)“ von Prof. Dr. Erich Wanker am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC) Berlin-Buch durchgeführt. Hierzu wurde eine spezielle automatisierte Hochdurchsatz (*high throughput*) Y2H-screening Technik angewandt. Diese Technik ermöglicht das Screenen einzelner Proteine gegen eine 23.000 Einzelklon-Bibliothek, die ca. 75% des proteinkodierenden Bereichs des menschlichen Genoms abdeckt. Das Grundprinzip des Y2H-Systems besteht darin, dass ein bekanntes Köder- (*Bait*) und ein potentiell interagierendes Beute- (*Prey*) Protein zeitgleich in einen genetisch veränderten Hefestamm transformiert werden und auf Interaktion miteinander getestet werden. Die in der Hefe synthetisierten Köder- und Beuteproteine

sind jeweils an einen getrennten Teil des Transkriptionsfaktors GAL4 fusioniert. Falls Köder- und Beuteprotein miteinander interagieren, kommen die beiden Teile des Transkriptionsfaktors GAL4 in räumliche Nähe. Dies führt zur Aktivierung eines Reportergens, welches das Wachstum der Hefe auf SD4 Selektivmedium (-Leu-Trp-Ura-His) ermöglicht. Des Weiteren wird dadurch ein zweites Reportergen (*LacZ*) aktiviert, wodurch das Enzym β -Galactosidase hergestellt wird dessen Aktivität über eine Farbumschlagsreaktion (X-Gal) sichtbar gemacht werden kann. Detaillierte Beschreibungen dieser cyto-Y2H-Screens finden sich zum einen in der Dissertation von Matthias Könn [55] der AG Neuroproteomics und den Publikationen [56], [57] und [58]. In den durchgeführten Screens wurde der verwendete Köder jeweils viermal auf Aktivierung beider Reportergene getestet. Aus der Anzahl der positiven Aktivierungen wurde eine Score gebildet (0-1). Berechnung der Score: $X = \text{SD4} + \text{LacZ} + \text{LacZ}$ (max. 12); Y2H-Score = $X/12$ (0-1). Bei der Berechnung der Y2H-Score, wurde die Aktivierung des *LacZ*-Reportergens stärker gewertet, da diese nur nach einer starken Aktivierung des Reporters verlässlich detektiert werden kann. Anhand der gebildeten Y2H-Score wurden die identifizierten Proteine sortiert. Proteine die eine hohe Y2H-Score aufweisen, sollten eine höhere Wahrscheinlichkeit haben physiologische Interaktionspartner zu sein.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach deren molekularen Gewicht wurde eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) unter denaturierenden Bedingungen nach Laemmli [59] durchgeführt. Die zu untersuchenden Proteingemische wurden vor der Gelelektrophorese mit Protein-Probenpuffer versetzt. Der verwendete Probenpuffer enthielt *Sodium dodecyl sulfate* (dt. Natriumdodecylsulfat), welches die Eigenladung der Proteine mit negativer Ladung überdeckt und Wasserstoffbrücken auftrennt. Zusätzlich enthielt der Probenpuffer das reduzierendes Agens β -Mercaptoethanol zur Spaltung von Disulfidbrücken. Die mit Probenpuffer versetzten Proteine wurden anschließend bei 95°C für 10 min im Thermomixer denaturiert. Daraus resultierend können die so behandelten aufgespalteten und negativ beladenen Proteine im elektrischen Feld ausschließlich aufgrund deren molekularen Größe aufgetrennt werden. Das Proteingemisch wurde

anschließend im Sammelgel (3%) bei 60-80 V synchronisiert und im Trenngel (12%) bei 120-150 V separiert. Zur Einschätzung der Proteingrößen wurde als Größenstandard der ColorPlus™ Prestained Protein Marker, Broad Range (7-175 kDa) der Firma NEB verwendet. Die separierten Proteine wurden anschließend im Gel mit Coomassie Brilliantblau R-250 angefärbt oder zur spezifischen Detektion von ausgesuchten Proteinen auf Polyvinylidenfluorid- (PVDF) Membranen transferiert und mit spezifischen Antikörpern im Immunblot detektiert.

Tabelle 16: Verwendete Puffer in der SDS-PAGE Gelelektrophorese. Abk. TEMED: N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin, APS: Ammoniumperoxodisulfat, SDS: *Sodium dodecyl sulfate*, dt. Natriumdodecylsulfat.

Bezeichnung	Zusammensetzung
SDS-PAGE-Sammelgel	3% (v/v) Acrylamid 0,15% (v/v) Bisacrylamid 125 mM Tris-HCl (pH 6,8); 0,1 (v/v) % SDS 0,25% (v/v) TEMED; 2,5% (v/v) APS
SDS-PAGE-Trenngel (12 %)	12% (v/v) Acrylamid 0,09% (v/v) Bisacrylamid 500 mM Tris-HCl (pH 8,8); 0,1 (v/v) % SDS 0,02% (v/v) TEMED; 0,1% (v/v) APS
4x SDS-Probenpuffer	250 mM Tris-HCl pH 6,8 20% (v/v) β -Mercaptoethanol 40% (v/v) Glycerol 16% (w/v) SDS; Bromphenolblau
5x SDS-PAGE-Laufpuffer	1,5% (w/v) Tris-Base; 7,2% (w/v) Glycin 0,5% (w/v) SDS
Coomassie-Färbelösung	45% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure 0,25% (w/v) Coomassie Brilliantblau R-250
Coomassie-Entfärbelösung	45% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure

2.2.3.2 Immunblot

Im Immunblot wurden Proteine mittels spezifischer Antikörper auf einer Trägersmembran detektiert. Dazu wurden die im SDS-PAGE-Gel aufgetrennten Proteine zunächst mittels eines Elektrotransfers nach dem *Tank-Blot*-Verfahren auf die verwendeten PVDF-Membranen (Carl Roth GmbH) übertragen. Die PVDF-Membranen wurden zunächst mit Methanol aktiviert und anschließend in IB-Transferpuffer (Tabelle 17) auf die Gele aufgetragen. Der Elektrotransfer der Proteine in IB-Transferpuffer wurde bei 250 mA und regulierender elektrischer Spannung für 90 min durchgeführt. Anschließend wurden die PVDF-Membranen in 10% (w/v) Magermilch/TBT für 10 min bei RT inkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Daraufhin wurde der Primärantikörper gegen das zu detektierende Protein in 5% (w/v) Magermilch/TBT

über Nacht bei 4°C auf einem Tischschüttler inkubiert. Nach dreimaligem waschen mit PBS-Brij für jeweils 10 min und anschließend waschen mit PBS wurden die Membranen mit einem an HRP (*Horseradish Peroxidase*, dt. Meerrettichperoxidase) gekoppelten Sekundärantikörper in 5% (w/v) Magermilch/TBT für 1-3 h inkubiert. Nach erneutem dreimaligem waschen mit PBS-Brij und anschließend PBS waschen, wurden die PVDF-Membranen mit ECL (*enhanced chemiluminescence*) entwickelt. Dazu wurde das *Western Lightning Plus-ECL* (PerkinElmer) nach Herstellerangaben verwendet. Das in dem ECL System enthaltene Luminol wird durch die an dem Sekundärantikörper gebundene Peroxidase zu 3-Aminophthalat oxidiert. Bei dieser Reaktion wird Licht emittiert und verstärkt, welches proportional zur vorhandenen Proteinmenge bzw. gebundenem Zweitantikörper ist. Das emittierte Licht kann anschließend auf Röntgenfilmen (Biomax, Kodak) detektiert und analysiert werden.

Tabelle 17: Im Immunblot verwendete Lösungen und Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x TBT	500 mM Tris-HCl; 1,5 M NaCl 1% (v/v) Tween ; pH 7,5
IB-Transferpuffer	1,1% (w/v) Glycin; 0,24% (w/v) Tris-Base 25% (v/v) Methanol; 0,01% (w/v) SDS
PBS (10x)	1,4 M NaCl; 27 mM KCl; 100 mM Na ₂ HPO ₄ 18 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
PBS-Brij	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ ; 0,2% (w/v) Brij; pH 7,4

2.2.3.3 Affinitätschromatographien

Affinitätschromatographien wurden durchgeführt um einzelne getagte Proteine aus komplexen Proteingemischen aufzureinigen. Die in diesen Chromatographien aufgereinigten Proteine wurden anschließend in verschiedenen funktionellen Experimenten analysiert oder assoziierte Interaktionspartner identifiziert. In allen aufgeführten Experimenten wurden ausschließlich Puffer verwendet, die auf Basis des in Tabelle 18 aufgeführten Phosphatpuffers (P-Puffer oder Pp) beruhen. Etwaige Zusätze sind ebenfalls in der Tabelle 18 und im weiteren Textverlauf aufgeführt.

Tabelle 18: Verwendete Phosphatpuffer für Affinitätschromatographien

Bezeichnung	Zusammensetzung
Phosphatpuffer (Pp)	50 mM KH_2PO_4 und K_2HPO_4 ; pH 7,4 150 mM NaCl
Allg. Lyse-Puffer	Pp-Puffer + 0,5-1% (v/v) Triton X-100 Proteaseinhibitoren: <i>cOmplete protease inhibitor cocktail tablets</i> (Roche)
Allg. Wasch-Puffer	Pp-Puffer
His-Tag TALON-Wasch-Puffer	Pp-Puffer + 10 mM Imidazol
His-Tag TALON-Elutions-Puffer	Pp-Puffer + 200 mM Imidazol

2.2.3.3.1 Aufreinigung eukaryotisch hergestellter Proteine

Eukaryotische Proteinsynthesen wurden in COS-7-, C2C12- und H9c2-Zellen (Tabelle 3) durchgeführt. Die hergestellten Proteine wurden mit Myc-/6xHis-Tags (pcDNA3.1(-)) oder FLAG-Tags (pFLAG-CMV-D11) versehen. Nach der Synthese für 24-48 h wurden die verwendeten Zellen in Triton X-100 haltigem Lyse-Puffer (Tabelle 18) für 30 min bei 4°C auf dem Drehrad aufgeschlossen. Anschließend wurde das Zelllysate bei zunächst 1000 g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Dieser Schritt wurde mit 16.000 g für 10 min bei 4°C wiederholt. Der Überstand wurde anschließend mit den vom Hersteller empfohlenen Mengen Säulenmaterial versetzt. Myc/6xHis markierte Proteine wurden mit TALON-Beads (TALON® *Metal Affinity Resins* (Clontech)) versetzt (His-Tag Aufreinigung) und FLAG-getagte Proteine mit FLAG-M2-Agarose (Sigma-Aldrich). Die Menge des verwendeten Säulenmaterials variierte je nach Ansatz und Experiment. Daraufhin wurden die Lysate für 2-24 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Nach der Bindung der getagten Proteine an die Affinitätssäule wurden die Beads 3-4x mit kaltem Phosphatpuffer gewaschen. Anschließend wurden die Myc/6xHis markierten Proteine mit 200 mM Imidazol in Phosphatpuffer eluiert. Die eluierten Proteine wurden entweder für spätere Analysen in flüssigem N_2 eingefroren und bei -80°C bis zur Analyse gelagert oder mit Probenpuffer versetzt und im Immunblot analysiert. FLAG-getagte Proteine wurden nicht in funktionellen oder analytischen Experimenten verwendet und daher nicht unter nativen Bedingungen eluiert. Eine Elution der FLAG getagten Proteine von den FLAG-M2-Agarose Beads erfolgte durch Versetzung mit Protein-Probenpuffer und anschließendem aufkochen der Beads bei 95°C für 10 min und 1000 rpm im Thermocycler.

2.2.3.3.2 Ko-Immunpräzipitations-Experimente

Ko-Immunpräzipitationen (Ko-IPs) wurden durchgeführt um Protein-Protein-Interaktionen (PPIs) zu bestätigen. Die Durchführung der Ko-IP Experimente entspricht den in 2.2.3.3.1 beschriebenen Affinitäts-Aufreinigungen. Abweichungen von dem in 2.2.3.3.1 beschriebenen Protokoll werden im Weiteren beschrieben. In den durchgeführten Ko-IP Experimenten sind beide auf Interaktion zu testenden potentiellen Interaktionspartner bekannt. Die zu testenden Proteine (MuRFs und potentielle Interaktionspartner) wurden zunächst simultan in COS-7 Zellen im 6 well-Schalen Format (80.000 Z/6well) synthetisiert. Die MuRFs wurden mit Myc-/6xHis-Tags und die Interaktionspartner (Iap) mit FLAG-Tags hergestellt. Anschließend wurde der potentielle Iap der MuRFs über ANTI-FLAG M2-Agarose (Sigma-Aldrich) aufgereinigt. Die Bindung an die FLAG-Säule sowie anschließende Waschschrte erfolgten in Phosphatpuffer ohne Zusätze für 2-3h bei 4°C auf dem Drehrad. Die Elution der Proteine erfolgte durch Zugabe von Protein-Probenpuffer und 95°C für 10 min und 1000 rpm im Thermocycler. Falls das zu interagierende Protein (MuRFs) Ko-Präzipitiert wurde, konnte eine Interaktion bestätigt werden. Um auszuschließen, dass die MuRFs nicht unspezifisch an das FLAG-Säulenmaterial binden, wurde in der Negativkontrolle überprüft, ob die MuRFs an die verwendete FLAG-Säule binden können. Ist dies nicht der Fall, stellt die Ko-Präzipitation des MuRF-Proteins eine spezifische Interaktion mit dem zu testenden Protein dar.

2.2.3.3.3 SILAC-AP-MS

SILAC (*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) Affinitätspräzipitationen (AP) mit anschließender massenspektrometrischer Analyse (SILAC-AP-MS) wurden durchgeführt um neue MuRF-Interaktionspartner zu identifizieren. In einem typischen SILAC Experiment werden zwei Zellpopulationen unabhängig voneinander kultiviert. Die erste Population wird mit normalen Aminosäuren kultiviert. Die zweite Population wird mit Aminosäuren kultiviert, die mit schweren nichtradioaktiven Isotopen markiert sind (^{13}C anstatt ^{12}C). Diese schwereren Aminosäuren (z.B. Lysin-8 und Arginin-10) werden in Proteine bei der Synthese eingebaut. Nach Durchführung der jeweiligen Experimente wie z.B. APs werden beide Protein-Populationen vereinigt. In der MS-Analyse können die beiden Protein-Populationen aufgrund des leichten Massenunterschiedes voneinander unterschieden werden. Die Durchführung der APs

entspricht der in 2.2.3.3.1 beschriebenen für Myc/6xHis markierte Proteine. Die Bindung der Myc/6xHis markierten MuRFs erfolgte in P-Puffer mit 10 mM Imidazol zur Verminderung von unspezifischen Bindungen an das Säulenmaterial für 3 h bei 4°C auf dem Drehrad. Die Elution erfolgte mit 200 mM Imidazol in P-Puffer. Die Eluate wurden in flüssigem N₂ eingefroren und bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -80°C gelagert.

2.2.3.3.4 Aufreinigung prokaryotisch hergestellter Proteine

Rekombinante Proteine wurden für direkte Protein-Protein-Interaktionsstudien mit MuRF1 und WDR42A hergestellt. Diesbezüglich wurden MuRF1 und WDR42A mit Affinitätstags versehen, in *E. coli* synthetisiert und über passende Affinitätssäulen aufgereinigt. Tabelle 19 gibt einen Überblick über die verwendeten Tags, *E. coli* Stämme, Materialien und Bedingungen.

Tabelle 19: Synthese rekombinanter Proteine

Tag	<i>E. coli</i>	Plasmid	Selektion	Säule	Induktion (IPTG)
His	M15[pREP4]	pQE30	Amp	TALON	50 µM
GST	BL21-Rosetta (DE3)	pGEX-6P-1	Amp/Chlor	Glutathione Sepharose	50 µM
MBP	BL21-Rosetta (DE3)	pMAL-c4e	Amp/Chlor	Amylose Resin	100 µM

Zunächst wurden 0,3-0,5 µg Plasmid-DNA in *E. coli* transformiert und auf LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotika (Ab) über Nacht selektiert. Anschließend wurden 10-30 ml Vorkultur (TB-Medium + Ab) mit einem Bakteriums-Abstrich von der Selektionsplatte angeimpft und ebenfalls über Nacht bei 37°C und 200 rpm im Inkubationsschüttler vermehrt. Daraufhin wurde die Hauptkultur (TB-Medium + Ab, i.d.R. 500 ml) bei 37°C vorgewärmt und mit einer OD₆₀₀ von 0,2 aus der Vorkultur angeimpft. Diese Hauptkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6-0,8 kultiviert. Danach wurde die Hauptkultur im Schüttler auf 16°C herabgekühlt und die Proteinsynthese mit 50 oder 100 µM IPTG induziert. Die Synthese erfolgte für 24 h bei 16°C. Nach der Proteinsynthese wurden die *E. coli* Zellen bei 6000 g für 15 min bei 4°C pelletiert und der Mediums-Überstand verworfen. Die pelletierten Bakterien wurden anschließend in P-Puffer mit Proteaseinhibitoren aufgenommen und mittels French Press (2x) bei 4°C lysiert. Das Lysat wurde daraufhin für 30 min bei 12.000 rpm (17.200 g) und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches 50 ml Falcon überführt. Der Überstand wurde mit dem entsprechenden Säulenmaterial versetzt (2-4 ml) und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Bindung der Proteine an die Säule wurde diese 4x mit Pb

gewaschen. Die Elution von GST getagten Proteinen erfolgte durch abschneiden des GST-Tags mit der PreScission Protease (GE Healthcare) auf einem langsam drehenden Drehrad für 4 h bei 4°C. Die Elution von MBP getagten Proteinen erfolgte mit 10 mM Maltose oder durch abschneiden des Tags mit Enterokinase (NEB). Die Elution von His-getagten Proteinen wurde wie in 2.2.3.3.1 beschrieben mit 200 mM Imidazol durchgeführt. Die aufgereinigten Proteine wurden ggf. mit 10K Amicon-Säulen (Merck Millipore) aufkonzentriert und die Proteinmenge nach Lowry [60] bestimmt. Die anschließende Lagerung der rekombinanten Proteine erfolgte bei -80°C.

2.2.3.4 Direkte Protein-Protein-Interaktionsstudien

Direkte Protein-Protein-Interaktionsstudien wurden durchgeführt um eine direkte, von Ko-Faktoren unabhängige, PPI zwischen MuRF1 und WDR42A im zellfreien System zu bestätigen. Dazu wurde in *E. coli* synthetisiertes WDR42A-GST (Abschnitt 2.2.3.3.4) an Glutathion Sepharose über Nacht gebunden. Nach viermaligem waschen der WDR42A-GST gebundenen Beads wurde anschließend ein MuRF1-MBP Totallysat (Abschnitt 2.2.3.3.4) auf die WDR42A-GST gebundenen Beads gegeben und für 1 h auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Nach weiterem viermaligem waschen der Beads wurde der Ansatz in Protein-Probenpuffer aufgekocht und im Coomassie-Gel und Immunblot analysiert.

2.2.3.5 Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Analysen wurden durch die Technologie-Plattform (*Core Facility*) „Massenspektrometrie“ (Leitung Dr. Gunnar Dittmar) des Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin (MDC) Berlin-Buch durchgeführt. Die Messungen wurden mit *LTQ Orbitrap XL* und *Q Exactive* Massenspektrometern der Firma Thermo Fisher Scientific durchgeführt.

2.2.4 Zellbiologische Methoden und Mikroskopie

2.2.4.1 Zellkultur

Die verwendeten Zellen wurden nach den Empfehlungen der *American Type Culture Collection* (ATCC) in einem CO₂-Inkubator (BINDER) bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen, deren Eigenschaften, die Ursprungsspezies, das Ursprungsgewebe und ihre Herkunft sind in der Tabelle 3 aufgeführt. Standard-Zellkulturtechniken wie auftauen, passagieren und einfrieren der Zellen wurden ebenfalls nach den Empfehlungen der ATCC durchgeführt. Die verwendeten Zellkultur-

Medien sind in der Tabelle 9 aufgeführt. Alle Arbeiten wurden unter strikt aseptischen Bedingungen unter einer sterilen Werkbank der Firma BDK (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl) durchgeführt.

2.2.4.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Für verschiedene Applikationen wurde die Gesamt-Proteinmenge der verwendeten Zellen analysiert. Nach der Dauer des individuellen Experimentes wurden die kultivierten Zellen 1x mit PBS auf Eis gewaschen. Anschließend wurde 50-200 µl Lyse-Puffer (Tabelle 18) auf die Zellen gegeben und diese mit einem Zellschaber von der Kulturschale abgelöst. Die Zellen wurden für 30 min bei 4°C auf einem Drehrad aufgeschlossen, bei 16.000 g und 4°C das Lysat abzentrifugiert, der Überstand anschließend mit Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 10 min im Thermocycler bei 1000 rpm denaturiert. Die zu untersuchenden Proteine wurden anschließend mittels spezifischer Antikörper im Immunblot analysiert.

2.2.4.3 Transiente Transfektionen

Alle nachfolgend aufgeführten Transfektionen sind für Ansätze im 6 well-Schalen Format beschrieben. Abweichende Formate wurden proportional angepasst.

2.2.4.3.1 Liposomale Transfektionen

Liposomale Transfektionen wurden einerseits mit *FuGENE 6 Transfection Reagent* (Roche) bzw. dem äquivalenten *X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent* (Roche) und andererseits mit Lipofectamin (Invitrogen) in Kombination mit *PLUS™ Reagent* (Invitrogen) durchgeführt.

FuGENE 6 und X-tremeGENE 9 basierende Lipofektionen von einfach zu transfezierenden Zellen (COS-7) wurden wie folgt durchgeführt. Zunächst wurden 97 µl Serumfreies-Medium (SFM) mit 3 µl Transfektionsreagenz gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2 µg der zu transfezierenden Plasmid-DNA hinzugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben und die Proteinsynthese für mindestens 24 h durchgeführt.

Lipofectamin™ Transfektionen wurden mit schwierig zu transfezierenden Muskel-Zelllinien (C2C12 und H9c2) durchgeführt. Dazu wurden 2 µg Plasmid-DNA in 125 µl

SFM gelöst, mit 20 µl PLUS *reagent* versetzt und für 15 min in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß inkubiert. In einem zweiten Ansatz wurden 125 µl SFM mit 5 µl LipofectaminTM versetzt. Diese beiden Ansätze wurden anschließend vereinigt und für weitere 15 min inkubiert. Daraufhin wurde das Volumen auf 1 ml mit SFM aufgefüllt. Nach absaugen des serumhaltigen Mediums von den zu transfezierenden Zellen wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen gegeben. Nach 3 h wurde zu dem serumfreien Transfektionsansatz 2-3 ml serumhaltiges Vollmedium gegeben. Die Proteinsynthese erfolgte für mindestens 24 h.

2.2.4.3.2 siRNA-Transfektionen

Die verwendeten siRNAs (Tabelle 7) wurden von der Firma Dharmacon (Thermo Fisher Scientific) bezogen. Lyophilisierte siRNAs wurden in 1x siRNA-Puffer (60 mM KCl, 6 mM HEPES-pH 7,5 und 0,2 mM MgCl₂) der mit destilliertem RNase freiem Wasser hergestellt wurde, als 20 µM Stocklösungen gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Wiederholtes einfrieren und auftauen der Stocklösungen wurde vermieden bzw. auf ein Minimum reduziert. Alle siRNA-Arbeiten wurden mit RNase-freien Eppendorf-Reaktionsgefäßen (Biopur® Qualität) und Pipettenspitzen unter sterilen und möglichst RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Sämtliche Transfektionen wurden mit dem siRNA-Transfektionsreagenz DharmaFECT3 (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die Transfektion der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 60-80%, i.d.R. 2-3 Tage nach Passagierung der Zellen in antibiotikafreiem Vollmedium. Zunächst wurden 25 nM siRNA (\triangleq Endkonz. in 2 ml) in SFM gelöst und bei RT für 5 min inkubiert. Dazu wurden 10 µl eines 5 µM Stocks in 190 µl SFM gelöst (dies \triangleq 250 nM in 200 µl; \triangleq 25 nM in 2000 µl). Gleichzeitig wurden 6-10 µl DharmaFECT3 in SFM (194-190 µl) gelöst und ebenfalls für 5 min inkubiert. Beide Ansätze wurden anschließend vereinigt (400 µl) und für 20 min inkubiert. Dieser Ansatz wurde auf 2 ml mit antibiotikafreiem Vollmedium aufgefüllt und auf die zu transfezierenden Zellen gegeben. Nach 24 h erfolgte ein Mediumwechsel gegen komplettes Vollmedium mit Antibiotika. Der knock down erfolgte für insgesamt 72-96 h. Anschließend wurden Totallysate der Zellen im Immunblot auf die Effizienz des knock downs mittels spezifischer Antikörper gegen das entsprechende Protein überprüft.

2.2.4.3.3 Transiente adenovirale Transduktionen

Die in dieser Arbeit verwendeten Adenoviren wurden durch die Firma SIRION BIOTECH GmbH generiert und sind in der Tabelle 4 aufgeführt. Die entsprechende Menge Viruspartikel (i.d.R. MOI 200, Erklärung siehe Tabelle 4) wurde nach Kultivierung der Zellen in Vollmedium auf die Zellen gegeben und für den Zeitraum des Experimentes mit den Zellen inkubiert (alle arbeiten im S2-Labor). Anschließend wurden die Viren durch intensives waschen mit PBS (mindestens 6x) entfernt. Die Zellen wurden daraufhin je nach Applikation entweder aufgeschlossen und die überexprimierten Proteine in einer AP aufgereinigt oder die Totallysate im Immunblot analysiert.

2.2.4.4 Cycloheximid-Abbau-Experimente

Cycloheximid (CHX) ist ein Antibiotikum, welches aus Streptomyceten (*Streptomyces griseus*) isoliert wird. Es inhibiert die Proteinbiosynthese an den Ribosomen wodurch keine neuen Proteine mehr synthetisiert werden können. Demzufolge kann durch CHX Behandlung von Zellen in Kultur der Abbau von Proteinen analysiert werden. Die im 6 well-Schalen Format kultivierten Zellen (COS-7, C2C12 und H9c2) wurden mit 100 µg/ml CHX für 0-24h behandelt. Anschließend wurden spezifische Proteine des Totallysates im Immunblot auf dessen Halbwertszeit analysiert.

2.2.4.5 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen

Auf Deckgläsern kultivierte Zellen wurden mit Paraformaldehyd (PFA) für spätere Applikationen wie Immunfärbungen und mikroskopische Untersuchungen dauerhaft fixiert. Dazu wurden die Zellen auf Gelantine (Sigma) beschichteten Deckgläsern bis zu einer Konfluenz von 70-90% kultiviert. Anschließend wurden die Zellen jeweils 2x mit PBS gewaschen und mit 4% PFA in PBS für 20 min bei RT fixiert. Daraufhin wurden die fixierten Zellen 1x mit PBS gewaschen und mit 0,2% Triton X-100 haltigem PBS für 20 min bei RT permeabilisiert. Anschließend wurde durch intensives waschen mit PBS das Triton X-100 entfernt. Die Zellen wurden bis zur Färbung in PBS bei 4°C gelagert.

2.2.4.6 Darstellung des Aktinzytoskeletts

Zur Visualisierung von F-Aktin in der Fluoreszenzmikroskopie wurde das aus *Amanita phalloides* isolierte und F-Aktin bindende Phalloidin verwendet. Es wurde zum einen mit Fluorescein Isothiocyanate (FITC, Grün) und zum anderen Tetramethylrhodamine B isothiocyanate (TRITC, Rot) markiertes Phalloidin verwendet. Die auf Deckgläschen mit

PFA fixierten und permeabilisierten Zellen wurden mit 1 µl FITC/TRITC (Stock 0,5 mg/ml) in 100 µl PBS für 40 min. bei RT in einer dunklen Kammer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bis zu 3x mit PBS gewaschen und mit *ProLong® Gold antifade reagent with DAPI* (Invitrogen) eingedeckelt.

2.2.4.7 Indirekte Immunfluoreszenz

Zunächst wurden die zu untersuchenden Zellen auf Gelantine beschichteten Deckgläschen kultiviert und wie in 2.2.4.5 beschrieben mit 4% (w/v) PFA in PBS fixiert und 0,5% (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen und je nach verwendetem primärem Antikörper (pAK) mit 5% (v/v) Ziegsenrum oder BSA in PBS (Blockpuffer) für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper in Blockpuffer inkubiert. Die verwendeten primären Antikörper sind in der Tabelle 10 aufgelistet. Anschließend wurden die Zellen 3x mit PBS gewaschen und mit Fluoreszenzfarbstoff konjugiertem Sekundärantikörper (Tabelle 11) in PBS (ohne Serum) für 1 h bei RT in Dunkelheit inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut 3x mit PBS gewaschen und mit *ProLong® Gold antifade reagent with DAPI* eingedeckelt.

2.2.4.8 Fluoreszenzmikroskopie

Für fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurde das inverse Fluoreszenzmikroskop *Axio Observer Z1* der Firma Zeiss mit entsprechenden Filtersätzen (Tabelle 12) und Objektiven (Tabelle 13) verwendet. Die Dokumentation erfolgte mit einer gekühlten CCD Kamera (AxioCam MRm) in Verbindung mit der Zeiss-Aufnahme-Software AxioVision (rel. 4.7.2.0).

2.2.5 Tierexperimentelle Arbeiten

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Tierexperimente wurden nach den Bestimmungen des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Sämtliche tierexperimentellen Arbeiten wurden durch Kooperationspartner der AG „Molekulare Kardiologie und muskuläre Proteindegradation“ von PD Dr. med. Jens Fielitz und Kollegen durchgeführt.

2.2.5.1 Transverse Aorten-Konstriktion

Die transverse Aorten-Konstriktion (TAC, *Transverse aortic constriction*) wurde durchgeführt um kardiale Herzmuskelhypertrophie in adulten Mäusen zu induzieren. In

den TAC operierten Mäusen wurde der Thorax geöffnet und die transverse Aorta mit einem Seidenfaden abgebunden und somit die Durchflussfläche verringert. Durch den verminderten Blutfluss entwickelt sich eine kompensatorische Herzmuskelhypertrophie. Scheinoperierte Mäuse durchliefen den gleichen Operationsvorgang nur ohne Konstriktion der transversen Aorta.

2.2.5.2 Hunger induzierte Skelettmuskelatrophie

Um Skelettmuskelatrophie durch Hunger in Mäusen zu induzieren, wurde männlichen C57BL/6N Mäusen mit einem Alter von 6-8 Wochen für 24 h und 48 h die Nahrung entzogen. Diese Mäuse wurden jeweils nach 0 h, 24 h und 48 h Hunger-induzierter Atrophie getötet. Als Kontrollen wurden Nachkommen des gleichen Wurfes identisch behandelt ohne jedoch Hunger-Atrophie zu induzieren. Diese wurden ebenfalls nach 0 h, 24 h und 48 h getötet. Anschließend wurden den Mäusen verschiedene Gewebeproben entnommen u.a. auch die Skelettmuskel Gastrocnemius plantaris (GP) und Tibialis anterior (TA). Diese wurden lysiert und anschließend im Immunblot analysiert.

2.2.5.3 Denervations-induzierte Skelettmuskelatrophie

Dazu wurden 12 Wochen alte männliche C57BL/6N Mäuse verwendet. In diesen Mäusen wurde mittels Ligation des linken Ischiasnervs (*sciatic nerve*) Denervations-Skelettmuskelatrophie induziert. Das Muskelgewebe der kontra-lateralen Beine der Mäuse wurde als Sham-Kontrolle verwendet. Zusätzlich wurde das Muskelgewebe von nicht operierten Mäusen als zweite Kontrolle verwendet. Drei operierte, drei nicht operierte und drei Sham-Mäuse wurden nach 7, 14 und 21 Tagen getötet, deren Skelettmuskel (GP und TA) entnommen, diese lysiert und äquivalente Proteinmengen im Immunblot analysiert.

3 Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es neue Interaktionspartner (Iap) der MuRFs zu identifizieren, die potentiell Teil eines MuRF-Multiproteinkomplexes sein könnten. Anschließend sollte der Einfluss einzelner neu entdeckter MuRF-Iap auf die Funktion der E3-Ubiquitin-Ligasen charakterisiert werden. Um neue MuRF Interaktionen zu finden, wurden zwei Methoden angewandt: 1. Das Y2H-System und 2. SILAC-AP-MS.

3.1 Identifizierung neuer MuRF-Interaktionspartner

3.1.1 Hochdurchsatz Hefe-Zwei-Hybrid-Screening

Zur Findung neuer MuRF-Iap wurde als erste Methode ein automatisiertes Hochdurchsatz Hefe-Zwei-Hybrid-System (*Yeast Two-Hybrid* System, Y2H) verwendet (in Kooperation mit Prof. Dr. E. Wanker, MDC Berlin-Buch).

Ursprünglich sollten alle MuRFs (1, 2 und 3) in voller Länge (entspricht der vollständigen cDNA-Sequenz) als Köder im Y2H verwendet werden. Diesbezüglich wurden die volle Länge cDNA-Konstrukte auf Autoaktivierung der Y2H-System Reportergene (*HIS3* und *LacZ*) getestet, um die Identifizierung von unspezifischen Interaktionen auszuschließen. Die Autoaktivitätstests ergaben, dass MuRF1 und 2, jedoch nicht MuRF3, in der Lage waren eine Expression der Reportergene herbeizuführen. Dementsprechend konnten MuRF1 und 2 volle Länge nicht verwendet werden. Deshalb wurden verschiedene N- und C-terminal verkürzte Domänen-Teilkonstrukte für MuRF1 und 2 generiert (Abbildung 4) und auf Autoaktivierung getestet.

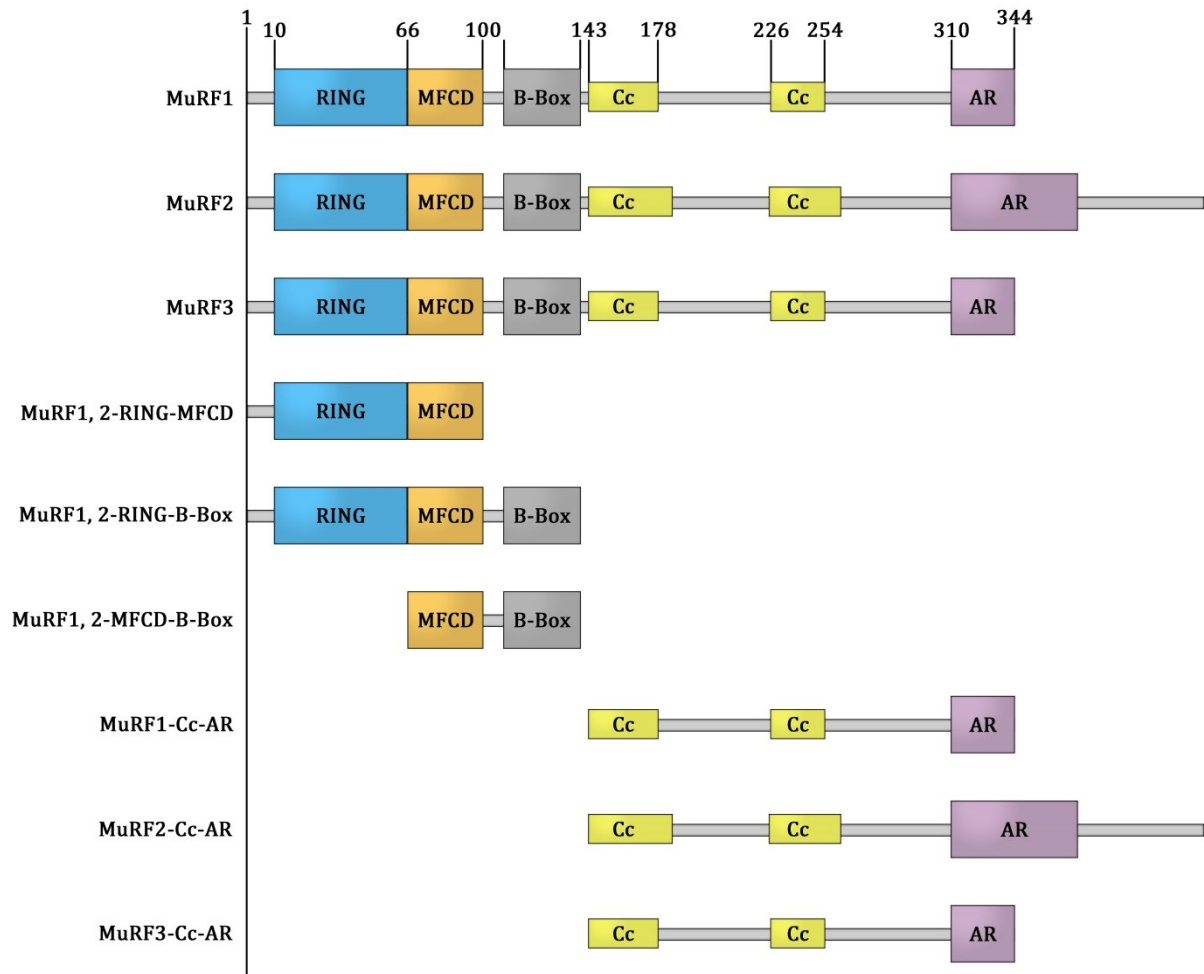


Abbildung 4: MuRF Domänen-Teilkonstrukte als Köder in Y2H-Screens. Diese Teilkonstrukte der MuRFs wurden in den Y2H-Screens als Köder verwendet: MuRF1, 2 und 3 volle Länge, MuRF1 und 2 RING-finger bis B-Box, MuRF1 und 2 RING-finger bis MFCD, MuRF1 und 2 MFCD bis B-Box und MuRF1, 2 und 3 *Coiled coil* Domäne 1 bis C-Terminus. Abk. MFCD: *MuRF-family-conserved* Domäne, Cc-AR: *Coiled coil* (Cc) bis *Acidic rich* (AR). Abbildung verändert nach [45].

Die N-terminalen MuRF1 und 2 Konstrukte zeigten keine Autoaktivierung, die C-terminalen Konstrukte schon. Die Ergebnisse der Autoaktivitätstests sind in Tabelle 20 aufgeführt. Die nicht auto-aktivierenden Köderproteine wurden anschließend auf Interaktion mit Proteinen der 23.000 Einzel-Klon Bibliothek getestet. Die Anzahl der identifizierten positiven Klone der einzelnen Y2H-Screens sind in Tabelle 20 aufgelistet.

Tabelle 20: Auto-Aktivitätstests und Zusammenfassung der Y2H-Screens. Dargestellt sind zum einen die Ergebnisse der Auto-Aktivitätstests sowie die Anzahl an identifizierten positiven Klonen nach Durchführung der Y2H-Screens. Abk. siehe Abbildung 4.

Screen Name	Auto-Aktivierung	Positive Klone
MuRF1-volle Länge	+	-
MuRF1-Cc-AR	+	-
MuRF1-RING-MFCD-B-Box	-	224
MuRF1-RING-MFCD	-	174
MuRF1-MFCD-B-box	-	184
MuRF2-volle Länge	+	-
MuRF2-Cc-AR	+	-
MuRF2-RING-MFCD-B-Box	-	251
MuRF2-RING-MFCD	-	224
MuRF2-MFCD-B-Box	-	167
MuRF3-volle Länge	-	78
MuRF3-Cc-AR	-	32

Jedes Köderprotein wurde jeweils viermal in einem SD4 Selektivmedium (-Leu-Trp-Ura-His) Wachstumstest und viermal in einem β -Gal-Experiment mit jedem Beuteprotein auf Interaktion bzw. Aktivierung des entsprechenden Reportergens getestet. Auf Grundlage dessen konnte für jede einzelne Interaktion ein Y2H-Score gebildet werden (0-1, wobei 1 den maximale Y2H-Score darstellt; Berechnung des Score siehe Abschnitt 2.2.2). Somit konnten die positiven Klone nach ihrer Häufigkeit der Identifizierung in den einzelnen Screens sortiert werden. Das heißt Proteine, die in den individuellen Screens besonders häufig identifiziert wurden, haben einen hohen Y2H-Score und somit eine höhere Wahrscheinlichkeit physiologische MuRF-Interaktionspartner zu sein. Ausgewählte Ergebnisse (jeweils 30 Klone) der MuRF1 und 2 Domänen-Screens sind in Tabelle 21, der MuRF3-volle Länge Screens in Tabelle 22 und der MuRF3-Cc Screens in Tabelle 23 aufgeführt. Im digitalen Anhang sind die vollständigen Ergebnisse dargestellt.

Zusätzlich wurden 164 Proteine, die in sehr vielen vorangegangenen Y2H-Screens entdeckt wurden und aufgrund dessen als höchstwahrscheinlich unspezifische falsch-positive Proteine aufgefasst werden, identifiziert. Diese Proteine wurden als problematisch bewertet und aus den Ergebnissen der Screens aussortiert und in einer falsch-positiven Protein-Liste zusammengefasst (digitaler Anhang). Obwohl der Großteil dieser Proteine im Allgemeinen als falsch-positive Identifizierungen betrachtet werden können, kann nicht komplett ausgeschlossen werden, dass auch physiologische MuRF-Interaktionspartner in dieser Liste aufgeführt sind. Aufgrund dessen wurden diese Proteine in späteren Datenanalysen nicht ausgeschlossen (Abschnitt 3.1.3).

Tabelle 21: Auswahl der mit MuRF1 und 2 Domänen-Teilkonstrukten identifizierten positiven Klone.

Score	Gene ID	Gen Symbol	Gen-Name
0,8	27229	TUBGCP4	tubulin, gamma complex associated protein 4
0,8	8975	USP13	ubiquitin specific peptidase 13 (isopeptidase T-3)
0,7	23476	BRD4	bromodomain containing 4
0,7	5315	PKM2	pyruvate kinase, muscle
0,66	3693	ITGB5	integrin, beta 5
0,6	54014	BRWD1	bromodomain and WD repeat domain containing 1
0,6	815	CAMK2A	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II alpha
0,6	92196	DAPL1	death associated protein-like 1
0,6	3609	ILF3	interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa
0,6	343263	MYBPHL	myosin binding protein H-like
0,46	825	CAPN3	calpain 3, (p94)
0,46	154865	IQUB	IQ motif and ubiquitin domain containing
0,46	54507	ADAMTSL4	ADAMTS-like 4
0,46	8557	TCAP	titin-cap (telethonin)
0,46	7678	ZNF124	zinc finger protein 124
0,4	7347	UCHL3	ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3 (ubiquitin thiolesterase)
0,33	51239	ANKRD39	ankyrin repeat domain 39
0,33	114781	BTBD9	BTB (POZ) domain containing 9
0,33	64787	EPS8L2	EPS8-like 2
0,33	27178	IL1F7	interleukin 1 family, member 7 (zeta)
0,33	79931	TNIP3	TNFAIP3 interacting protein 3
0,33	10477	UBE2E3	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 3 (UBC4/5 homolog, yeast)
0,33	80344	WDR23	DDB1 and CUL4 associated factor 11
0,26	221120	ALKBH3	alkB, alkylation repair homolog 3
0,26	3481	IGF2	insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)
0,26	9039	UBA3	ubiquitin-like modifier activating enzyme 3
0,2	1499	CTNNB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
0,2	55709	KBTBD4	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 4
0,16	8396	PIP4K2B	phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, beta
0,13	11258	DCTN3	dynactin 3 (p22)

Tabelle 22: Auswahl der mit MuRF3-volle Länge identifizierten positiven Klone.

Score	Gen ID	Gen Symbol	Gen-Name
0,83	11021	RAB35	RAB35, member RAS oncogene family
0,67	8807	IL18RAP	interleukin 18 receptor accessory protein
0,67	7126	TNFAIP1	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1
0,67	3682	ITGAE	integrin, alpha E
0,67	57591	MKL1	megakaryoblastic leukemia (translocation) 1
0,67	259307	IL4I1	interleukin 4 induced 1
0,67	50717	WDR42A	DDB1 and CUL4 associated factor 8
0,67	56104	PCDHGB1	protocadherin gamma subfamily B, 1
0,67	57558	USP35	ubiquitin specific peptidase 35
0,67	85366	MYLK2	myosin light chain kinase 2
0,67	7415	VCP	valosin-containing protein
0,67	83933	HDAC10	histone deacetylase 10
0,67	5592	PRKG1	protein kinase, cGMP-dependent, type I
0,67	56987	BBX	bobby sox homolog (Drosophila)
0,67	29890	RBM15B	RNA binding motif protein 15B
0,67	8436	SDPR	serum deprivation response
0,50	9645	MICAL2	microtubule associated monooxygenase
0,50	80824	DUSP16	dual specificity phosphatase 16
0,50	7733	ZNF180	zinc finger protein 180
0,50	81793	TLR10	toll-like receptor 10
0,50	94122	SYTL5	synaptotagmin-like 5
0,50	252983	STXBP4	syntaxin binding protein 4
0,42	1774	DNASE1L1	deoxyribonuclease I-like 1
0,42	26190	FBXW2	F-box and WD repeat domain containing 2
0,33	84957	RELT	RELT tumor necrosis factor receptor
0,33	90427	BMF	Bcl2 modifying factor
0,33	1857	DVL3	dishevelled, dsh homolog 3 (Drosophila)
0,25	2048	EPHB2	EPH receptor B2
0,25	55632	G2E3	G2/M-phase specific E3 ubiquitin ligase
0,25	55754	TMEM30A	transmembrane protein 30A

Tabelle 23: Ausgewählte Ergebnisse des MuRF3-Cc-AR Screens.

Score	Gen ID	Gen Symbol	Gen-Name
1	8557	TCAP	titin-cap (telethonin)
1	8089	YEATS4	YEATS domain containing 4
0,83	2135	EXTL2	exostoses (multiple)-like 2
0,83	8655	DYNLL1	dynein, light chain, LC8-type 1
0,66	171482	FAM9A	family with sequence similarity 9, member A
0,66	203076	C8orf74	chromosome 8 open reading frame 74
0,66	5098	PCDHGC3	protocadherin gamma subfamily C, 3
0,58	27179	IL1F6	interleukin 1 family, member 6 (epsilon)
0,5	339416	ANKRD45	ankyrin repeat domain 45
0,5	9411	ARHGAP29	Rho GTPase activating protein 29
0,41	337880	KRTAP11-1	keratin associated protein 11-1
0,41	140691	TRIM69	tripartite motif-containing 69
0,33	3856	KRT8	Keratin, type II cytoskeletal 8
0,33	7412	VCAM1	vascular cell adhesion molecule 1
0,33	3267	AGFG1	ArfGAP with FG repeats 1
0,33	7329	UBE2I	ubiquitin-conjugating enzyme E2I
0,33	9818	NUPL1	nucleoporin like 1
0,33	84709	OSAP	chromosome 4 open reading frame 49
0,33	3298	HSF2	heat shock transcription factor 2
0,33	644186	C22orf41	chromosome 22 open reading frame 41
0,33	1616	DAXX	death-domain associated protei
0,25	1107	CHD3	protein 3
0,25	4129	MAOB	monoamine oxidase B
0,25	892	CCNC	cyclin C
0,25	51247	PAIP2	poly(A) binding protein interacting protein 2
0,25	348807	CCDC37	coiled-coil domain containing 37
0,25	8674	VAMP4	vesicle-associated membrane protein 4
0,25	3267	AGFG1	ArfGAP with FG repeats 1
0,25	83933	HDAC10	histone deacetylase 10
0,25	53371	NUP54	nucleoporin 54kDa

In den sechs durchgeführten MuRF1 und 2 Domänen-Screens wurden insgesamt 1244 Proteine identifiziert (mehrfach Identifizierungen eingeschlossen). Aufgrund der hohen Homologie von MuRF1 und 2 in den getesteten N-terminalen Bereichen wurden viele potentielle neue Interaktionspartner in mehreren oder allen der sechs Screens entdeckt. Insgesamt wurden 251 unterschiedliche Proteine in den MuRF1 und 2 Screens identifiziert. Bei einem Vergleich der drei MuRF1 Screens (Abbildung 5) wurde festgestellt, dass 147 Proteine mit allen drei MuRF1 Köderproteinen gefunden wurden und nur wenige Proteine ausschließlich in den einzelnen MuRF1 Screens. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in den MuRF2 Domänen-Screens beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

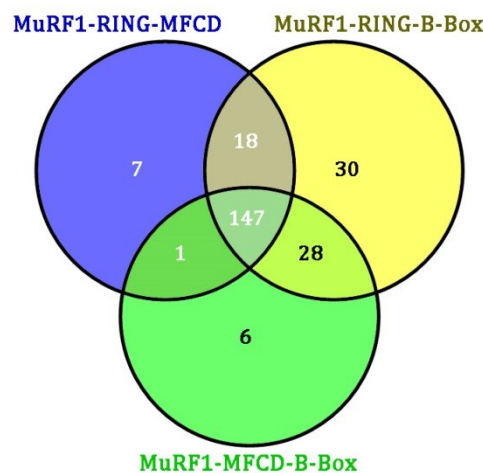


Abbildung 5: Vergleich der drei MuRF1 Domänen-Screens. Die meisten der mit MuRF1 identifizierten Proteine (147) wurden in allen durchgeführten MuRF1 Domänen-Screens gefunden. Dem hingegen wurden nur wenige Proteine ausschließlich in den einzelnen Screens als potentielle MuRF-Interaktionspartner entdeckt. Beispielsweise wurden nur sieben Proteine ausschließlich in dem MuRF1-RING-MFCD Screen identifiziert. Abk. siehe Abbildung 4.

Im Gegensatz dazu zeigte der Vergleich der MuRF1 und 2 Screens mit den beiden MuRF3 Screens ein geringeres Maß an Übereinstimmungen (Abbildung 6).

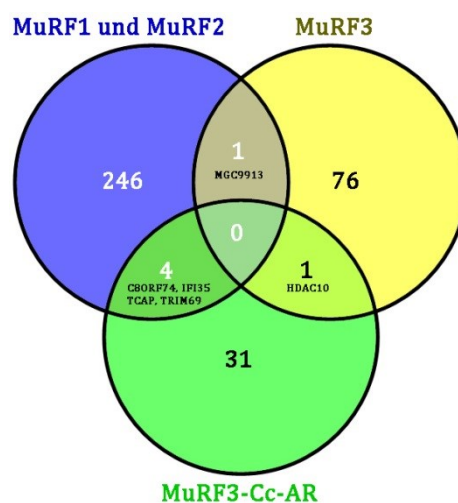


Abbildung 6: Vergleich der MuRF1 und 2 mit den MuRF3 Y2H-Screens. Ein Vergleich der MuRF1 und 2 Domänen-Screens mit den MuRF3 und MuRF3-Cc-AR Screens zeigt, dass nur wenige Proteine, die in den MuRF1 und 2 Screens gefunden wurden auch in den MuRF3 Screens identifiziert wurden. Ausnahmen sind hier z.B. HDAC10 oder der bereits bekannte MuRF1 und 2 Interaktionspartner TCAP. Abk. HDAC10: *Histone deacetylase 10*, TCAP: *Titin cap protein* (Telethonin), IFI35: *Interferon-induced 35 kDa protein*, TRIM69: *Tripartite motif-containing protein 69*.

Interessanterweise wurden in allen durchgeführten Screens bereits bekannte MuRF-Interaktionspartner identifiziert. Eines dieser Proteine, Titin-cap (TCAP) [45], wurde in allen durchgeführten Screens entdeckt (MuRF1, 2 und 3). Des Weiteren wurde *Ubiquitin-conjugating enzyme E2I* (UBE2I) [35] in dem MuRF3-Cc-AR und *Ubiquitin specific peptidase 13* (USP13) [35] in den MuRF1 und 2 Screens gefunden. Außerdem

wurden noch *Pyruvate kinase muscle* (PKM2) [45, 61], *Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3* (UCHL3) [62] und *RING finger protein 10* (RNF10) [63] mit MuRF1 und 2 als bereits bekannte Bindungspartner identifiziert.

Die Identifizierung dieser bereits bekannten Interaktionspartner zeigt das hohe Maß an Spezifität der durchgeführten Y2H-Screens. Aufgrund dessen kann angenommen werden, dass einige der entdeckten potentiellen neuen MuRF-Bindungspartner ebenfalls physiologische MuRF-Iap sein könnten. Zur Bestätigung dessen wurden ausgewählte Proteine der Y2H-Screens selektiert (Abschnitt 4.1.3) und auf Interaktion mit den MuRF-Proteinen mittels Ko-IPs untersucht (Abschnitt 3.1.4).

3.1.2 Identifizierung neuer MuRF-Interaktionspartner mittels SILAC-AP-MS

Als zweite Methode zur Identifizierung neuer MuRF-Interaktionspartner wurden die MuRFs mit einem Affinitätstag (6xHis-Tag) versehen, in SILAC markierten Herzmuskelzellen (H9c2) synthetisiert und anschließend eine affinitätschromatographische Reinigung der MuRF-Proteine inklusive der assoziierten Bindungspartner durchgeführt. Die mit dieser Methode präzipitierten Proteine wurden anschließend mittels Massenspektrometrie (MS) identifiziert.

Wie bereits gezeigt werden konnte, binden viele zelluläre Proteine unspezifisch an die verwendete TALON-Metall-Affinitätssäule (Kobalt). Dies erhöht die Gefahr falsche Interaktionen zu identifizieren. Um die unspezifischen von den spezifischen MuRF-Bindungen zu unterscheiden, wurden die verwendeten Zellen vor der Affinitätschromatographie mittels der SILAC (*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) Methode markiert. Für eine verlässliche SILAC-AP-MS-Analyse sollten mindestens 92-97% der Proteine die entsprechenden Aminosäuren inkorporiert haben. Diesbezüglich wurden die Zellen mindestens sieben Tage mit den SILAC-Aminosäuren kultiviert bzw. mindestens dreimal passagiert. In allen durchgeführten Experimenten lag die SILAC Markierungs-Effizienz zwischen 94% und 97% (Daten nicht gezeigt).

In den durchgeführten SILAC Experimenten wurden zwei unterschiedlich markierte Zellpopulationen verwendet. Die erste mit normalen Aminosäuren (Lysin-0, Arginin-0) markierte Population wurde als Kontrolle verwendet und mit einem Kontroll-Adenovirus transduziert (*promoter less*, AdV-PL). Die zweite Population wurde mit schweren Aminosäuren (Lysin-8, Arginin-10) markiert und mit den MuRFs (AdV-

MuRF1, 2 und 3) transduziert. Nach der Proteinsynthese wurden die Zellen lysiert und mit den Zelllysaten Affinitätsreinigungen (Abk. AP: *affinity purification*) durchgeführt. Anschließend wurden die Eluate der APs vereinigt und mittels Massenspektrometrie analysiert.

Als Expressionssystem wurden H9c2 Rattenkardiomyoblasten [64, 65] verwendet. Vorversuche mit diesen Herzmuskelzellen zeigten, dass diese mit herkömmlichen Methoden wie z.B. Calcium-Phosphat-Präzipitation, Lipofektion oder Elektroporation schlecht zu transfizieren sind. Da jedoch für die MS-Analyse große Proteinmengen benötigt werden, wurden Adenoviren (AdV) verwendet, um die MuRF-cDNA Expressionsplasmide in H9c2-Zellen zu transduzieren. Vorversuche mit AdV-GFP zeigten, dass ein Titer von MOI 200 (*multiplicity of infection*) und eine Expressionszeit von 48 h zu einer hohen Transduktionseffizienz (bis zu 100%) und Proteinmenge führten (Abbildung 7). Kürzere Expressionszeiten (24 h) sowie geringere Virusmengen (MOI 10, 50 und 100) führten zu geringeren Proteinmengen und längere Expressionszeiten (72 h) sowie höhere Virusmengen (MOI 500 und 1000) resultierten in keiner erhöhten Proteinmenge (Daten nicht gezeigt).

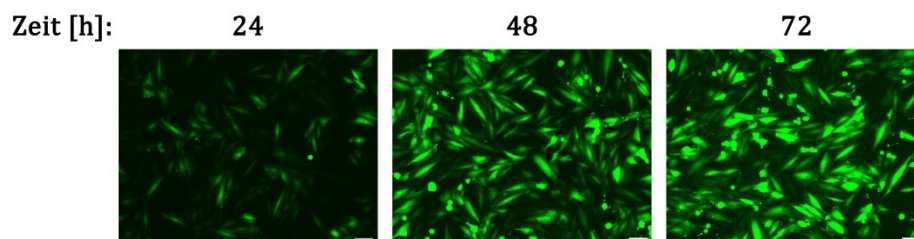


Abbildung 7: AdV-GFP Transduktionstests. H9c2-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 70-80% kultiviert, anschließend mit AdV-GFP mit einem MOI 200 transduziert und die Expression nach 24, 48 und 72 Stunden (h) unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Die höchst mögliche Transduktionseffizienz (ca. 100%) konnte nach 48 h gesehen werden. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

Weitere Optimierungsversuche mit AdV-MuRFs (Myc/6xHis markiert) ergaben, dass MuRF2 und MuRF3 ebenfalls mit einem MOI 200 und einer Expressionszeit von 48 h hohe Proteinmengen aufwiesen (Abbildung 8 B und C). Die MuRF1 Proteinmenge war unabhängig von dem benutzten AdV-MOI und der Expressionszeit relativ gering im Vergleich zu MuRF2 und MuRF3. Für andere E3-Ubiquitin-Ligasen konnte gezeigt werden, dass wenn diese keine Substrat-Proteine gebunden haben, sie sich selbst ubiquitinieren und damit den eigenen proteasomalen Abbau regulieren [66-68]. Aufgrund dessen wurden H9c2 Zellen mit AdV-MuRF1 (MOI 200) transduziert und mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt. Durch Inhibierung der Proteasom-Aktivität

konnte der UPS-abhängige Abbau von MuRF1 gestoppt werden (Abbildung 8 A). Im weiteren experimentellen Verlauf wurde aufgrund dessen in den MuRF1 Experimenten MG132 als Proteasom-Inhibitor verwendet. In den MuRF2 und 3 Versuchen wurde dieser nicht verwendet.

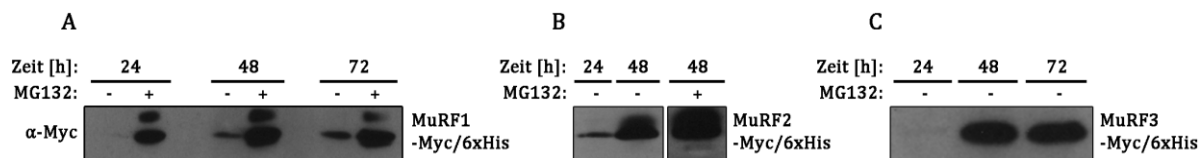


Abbildung 8: Testexpressionen mit AdV-MuRFs in H9c2-Zellen. H9c2-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit AdV-MuRF1, 2 und 3 (Myc/6xHis markiert) transduziert (MOI 200). Die Expression wurde nach 24, 48 und 72 h beendet, äquivalente Zellmengen lysiert und im Immunblot (IB) analysiert. Detektion der MuRFs im Immunblot mittels α-Myc (-Maus). (A) MuRF1 ist nach 24 h schwach und nach 48 und 72 h ebenfalls nur sehr schwach detektierbar. Durch Behandlung der Zellen mit 10 μM MG132 für 6-8 h lässt sich sehr viel mehr MuRF1 im Immunblot erfassen. (B) Die MuRF2 Expression ist nach 24 h erkennbar und nach 48 h ist die maximale Proteinmenge erreicht. Durch MG132 Behandlung lässt sich geringfügig mehr MuRF2 detektieren. (C) Die MuRF3 Proteinmenge ist nach 24 h sehr gering, hingegen nach 48 und 72 h in ausreichenden Mengen (MS-Vorversuch bestätigten dies, Daten nicht gezeigt) vorhanden.

Anschließend wurden die SILAC markierten H9c2 Zellen mit der optimierten Menge an AdV (MOI 200) transduziert (MuRFs bzw. Kontrollen) und die Expression für 48 h durchgeführt. Insgesamt wurden pro Experiment (MuRF1, 2 und 3 sowie drei Kontrollen) sechs APs durchgeführt, die MuRF und Kontroll APs vereinigt und eluiert. Wie in Abbildung 9 zu sehen ist wurden alle MuRFs effektiv in allen durchgeführten Experimenten synthetisiert (Lysate 1-6). Des Weiteren konnten MuRF-Proteine im Überstand detektiert werden, was darauf hin deutet, dass ein Teil der MuRF-Proteine nicht an die Säule gebunden hat (speziell in den MuRF2 Experimenten). Dies zeigt, dass die Affinitätssäule komplett gesättigt war und damit keine weiteren Bindungsstellen mehr frei sind für weitere MuRF-Bindungen. Dies hat den Vorteil, dass das Maß an unspezifischen Bindungen an die Säule verringert ist. Außerdem ist in Abbildung 9 (Eluate) zu sehen, dass die MuRFs effizient und zum größten Teil in den ersten beiden Elutionen mit 200 mM Imidazol von der Säule eluiert werden konnten. Jedoch ist auch ersichtlich, dass ein Teil der MuRF-Proteine nicht von der Säule gelöst werden konnte. Die Elutionen 1 und 2 wurden mit der Endoproteinase Lys-C tryptisch verdaut und die so entstandenen Peptide mittels MS analysiert. Jedes SILAC-AP-MS MuRF-Experiment wurde zweimal durchgeführt.

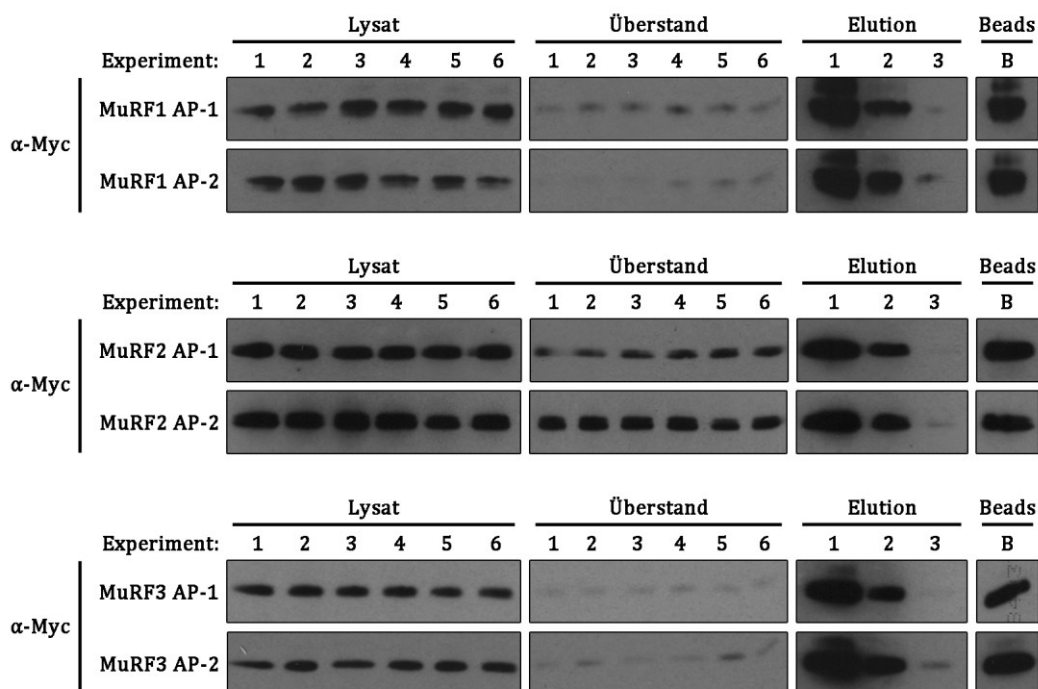


Abbildung 9: Affinitätschromatographische Reinigung der SILAC markierten MuRF-Proteine. Pro AP-Experiment wurden sechs große 75 cm² Zellkulturflaschen verwendet. H9c2-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70-80% mit den entsprechenden AdVs transduziert und die MuRFs für 48 h synthetisiert. Die letzten 6-8 h der MuRF1 Expression wurden in Anwesenheit von 10 µM MG132 durchgeführt. Anschließend wurden die Adenoviren durch exzessives Waschen mit PBS entfernt. Daraufhin wurden die Zellen lysiert und die APs durchgeführt. Proben wurden von dem Lysat, dem Überstand nach der Bindung der MuRFs an die Affinitätssäule, von den Elutionen 1-3 und den Beads nach der Elution genommen. Diese Proben wurden anschließend im Immunblot analysiert. Detektion der MuRFs im Immunblot mittels α-Myc (-Maus). Alle MuRFs wurden erfolgreich hergestellt (Lysate), bindeten größtenteils an die Säule (Überstand) und wurden überwiegend in der ersten Elution von den Beads eluiert (Elution). Ein gewisser Anteil der an die Säule gebundenen MuRFs konnte nicht von der Säule gelöst werden (Beads).

Die Tabelle 24 gibt einen Überblick über die durchgeführten Screens und die Menge an identifizierten Proteinen in den individuellen Screens

Tabelle 24: Ergebnisse der SILAC-AP-MS Screens. Dargestellt ist die Menge an identifizierten Proteinen der sechs Screens, sowie die Anzahl an Proteinen die mit einer größeren H/L Ratio als 1,5 entdeckt wurden.

Screen Name	Proteine	H/L Ratio $\geq 1,5$
MuRF1 Screen 1	780	131
MuRF1 Screen 2	827	98
MuRF2 Screen 1	833	35
MuRF2 Screen 2	818	37
MuRF3 Screen 1	238	15
MuRF3 Screen 2	408	29

Die Tabellen 25 und 26 zeigen exemplarisch 40 ausgewählte identifizierte Proteine und deren H/L Ratio (Heavy/Light SILAC Anreicherung) der jeweiligen Screens. Die Tabellen beinhalten die in den Screens am stärksten angereicherten Proteine. Im digitalen Anhang sind zusätzlich die detaillierten kompletten Ergebnisse der durchgeführten Screens aufgeführt.

Tabelle 25: Ausgewählte Ergebnisse der durchgeführten MuRF-SILAC-AP-MS Experimente. Aufgeführt sind die Gen-Namen der identifizierten Proteine und deren Anreicherung im SILAC-AP-MS Experiment.

MuRF1 Screen 1		MuRF1 Screen 2		MuRF2 Screen 1		MuRF2 Screen 2		MuRF3 Screen 1		MuRF3 Screen 2	
Gen-Name	Ratio H/L	Gen-Name	Ratio H/L	Gen-Name	Ratio H/L	Gen-Name	Ratio H/L	Gen-Name	Ratio H/L	Gen-Name	Ratio H/L
Hnrpll	27,25	MuRF2	15,96	MuRF2	40,00	Hnrpll	20,11	MuRF3	25,95	Zfp36l2	31,24
MuRF2	13,54	MuRF1	15,11	Hnrpll	20,69	MuRF2	17,11	H2afz	8,90	MuRF3	13,32
MuRF1	11,07	Jsrp1	4,37	Flnb	3,03	Kbtbd10	3,03	Ubc	4,87	Ltbp1	12,72
Ubc	5,56	Tnnc2	4,21	Ranbp10	2,36	Jsrp1	2,69	Mif4gd	2,04	Enh	8,56
Usp15	5,23	Neb	4,14	MAML2	2,15	FAM120C	2,27	Trmt112	1,99	Neb	6,41
Erlin2	4,19	Ubc	3,66	Smarca2	2,10	Neb	2,27	Rps4x	1,87	Cherp	5,22
Eif2s2	3,25	Hrc	3,03	Prdx5	2,00	Gpi	2,21	Hist1h2bh	1,78	Akr1a1	4,50
Eplin	3,22	Cad	2,97	Eif5b	1,95	Cyth2	2,06	Dvl3	1,65	Cryab	4,34
Rps25	2,99	Pdlim4	2,70	Clp1	1,82	Bag3	2,03	Cyc1	1,62	Fhl1	3,14
Nol5a	2,93	Map1s	2,65	Neb	1,80	Cad	1,99	Fads2	1,62	Mnt	2,88
Eif3b	2,88	Eplin	2,62	Kbtbd10	1,79	Slc30a1	1,98	Capn1	1,62	Ganab	2,59
Emilin1	2,77	Gys1	2,60	Rnf31	1,75	Ca3	1,94	Slc30a1	1,54	Tubb5	2,53
Ddx21	2,71	Crip2	2,49	Lrch3	1,70	Pck2	1,93	Hrc	1,54	Htra1	2,37
Tmem38a	2,62	Rps25	2,49	Aars	1,70	Tceb1	1,88	Luc7l2	1,52	Pabpc3	2,36
rCG_59132	2,49	Nedd8	2,19	Git1	1,67	Pgm3	1,81	Stim2	1,50	FAM120C	2,35
Cad	2,48	Hsp84	1,98	Nsdhl	1,64	Oplah	1,75	Alkbh8	1,49	Kab	2,28
Jsrp1	2,41	Hnrpll	1,87	Lkap	1,64	Rnf2	1,69	Adam12	1,48	Zeb2	2,27
Dctn1	2,37	EIF2C2	1,85	Arhgef7	1,64	WDR42A	1,67	Dynll1	1,48	Capn1	2,11
Hrc	2,30	WDR42A	1,70	Akap11	1,62	Pdzn3	1,59	Abcf2	1,45	Phf3	2,03
Crip2	2,30	Prkaca	1,68	Arhgef6	1,62	Fscn1	1,59	Ppp1r10	1,44	Sf3a1	2,00

Tabelle 26: Fortsetzung Ausgewählte Ergebnisse der MuRF-SILAC-AP-MS Experimente.

MuRF1 Screen 1		MuRF1 Screen 2		MuRF2 Screen 1		MuRF2 Screen 2		MuRF3 Screen 1		MuRF3 Screen 2	
Gen-Name	Ratio H/L	Gen-Name	Ratio H/L	Gen-Name	Ratio H/L	Gen-Name	Ratio H/L	Gen-Name	Ratio H/L	Gen-Name	Ratio H/L
Tax1bp1	2,28	Ca3	1,68	Cad	1,61	Dcp1a	1,58	Rps19	1,44	Atn1	1,92
Hp1bp3	2,27	Dctn1	1,56	Slc30a1	1,61	Ergic53	1,56	Sqstm1	1,42	Zdhhc13	1,90
Tnnc2	2,25	Vcp	1,46	Pdzrn3	1,56	Xirp1	1,54	Rbm27	1,41	Ddost	1,82
Mrlc2	2,04	Myh9	1,38	Iqsec2	1,54	ADSS	1,54	Rps9	1,41	rCG_41596	1,71
Hsp60	1,90	Calm1	1,33	Stard13	1,54	Camk2d	1,30	Ctif	1,41	Eif5a	1,70
Psmb2	1,77	Nedd4	1,17	Cyp8	1,53	Ckap4	1,22	Rpl21	1,40	Pyics	1,64
PRKACA	1,73	Cnn3	1,14	Dvl3	1,53	Capn4	1,20	Jmjd1c	1,40	Ccnt2	1,63
Ca3	1,59	Ckap4	1,09	Capza1	1,51	Calm1	1,18	Rbm33	1,40	Igf2bp2	1,53
WDR42A	1,56	Myh9	1,08	Wdr60	1,51	Ube3c	1,18	Ltbp1	1,39	Madh4	1,50
ADSS	1,52	Camk2d	1,05	WDR42A	1,35	Myh9	1,17	WDR42A	1,30	Rps11	1,48
Vcp	1,51	Wdr1	1,04	Calm1	1,34	Vcp	1,16	Camk2b	1,29	Flna	0,82
Capn2	1,18	Capn1	0,93	Ca3	1,31	Cnn3	0,93	Pabpc3	1,24	Smurf2	0,76
Ckap4	1,15	Brd4	0,90	Capn1	1,27	Nedd8	0,93	Ckap4	1,12	Ckap4	0,48
Alkbh8	1,15	Flnc	0,89	Hdac2	1,21	Nedd4	0,92	Tceb1	1,12	Rps4x	0,45
Capn1	1,08	Capn4	0,87	Capn4	1,19	Brd4	0,81	Brd4	0,96	Brd4	0,43
Flnc	0,93	Capn2	0,82	Camk2g	1,17	Sqstm1	0,81	Flna	0,84	Ca3	0,38
Daxx	0,86	Tuba4	0,73	Flnc	1,10	Flna	0,80	Pdlim5	0,82	Nedd4	0,38
Flna	0,58	Flna	0,59	Nedd4	0,99	Capn2	0,69	Cnn1	0,79	Pkm2	0,29
Fhl1	0,53	Fhl1	0,59	Ppp1cc	0,99	Fhl1	0,61	Fhl1	0,57	Camk2b	0,19
C1qtnf3	0,01	C1qtnf3	0,01	C1qtnf3	0,01	C1qtnf3	0,02	C1qtnf3	0,11	C1qtnf3	0,07

Wie im Y2H beobachtet, zeigte ein interner Vergleich der SILAC-AP-MS Daten, dass in den MuRF1 und 2 Screens sehr viele ähnliche Proteine identifiziert wurden. Hingegen wurden in den MuRF3 Screens weniger und andere Proteine gefunden (Datenanalysen nicht gezeigt). Des Weiteren konnte in jedem SILAC-AP-MS Experiment das jeweils verwendete MuRF-Protein selber identifiziert werden und war gleichzeitig das mit am stärksten angereicherte Protein (Tabelle 25). Darüber hinaus wurden zusätzlich in den individuellen Screens andere MuRF-Familienmitglieder gefunden, welche ebenfalls zu den am stärksten angereicherten Proteinen gehörten. So wurde im MuRF1 Screen auch MuRF2 entdeckt. Wie in den Y2H-Screenings wurden in den SILAC-AP-MS Experimenten bereits bekannte MuRF-Interaktionspartner identifiziert. Hierzu gehören, Troponin C (TNNC) [40], Nebulin (NEB) [45], *Four and a half LIM domain 1* (FHL-1) [49], Filamin C (FLN C) [39], *Pyruvate kinase muscle* (PKM2) [45, 61], Sequestosome-1 (SQSTM1) [37] und Ubiquitin (UBC) [46]. Die Identifizierung der bereits bekannten MuRF-lap zeigt erneut die hohe Spezifität der durchgeführten Experimente und legt nahe, dass andere stark angereicherte Proteine ebenfalls physiologische MuRF-bindende-Proteine darstellen könnten. Ausgesuchte Proteine (Selektion siehe Abschnitt 4.1.3) wurden auf Interaktion mit den MuRFs mittels Ko-IP getestet (Abschnitt 3.1.4).

3.1.3 Vergleich der Datensätze, Datenanalyse sowie Selektion

Um Proteine zu identifizieren, die mit besonders hoher Wahrscheinlichkeit MuRF-Interaktionspartner darstellen könnten, wurden die mit beiden Screening Methoden erfassten Datensätze miteinander verglichen und überprüft ob Proteine mit beiden Methoden gefunden werden konnten. Diesbezüglich wurden die kompletten Datensätze inklusive der schwach angereicherten Proteine der SILAC-AP-MS Experimente und der im Y2H als höchstwahrscheinlich unspezifisch identifizierten Proteine (Abschnitt 3.1.1) beider Screening-Methoden miteinander verglichen. Der Vergleich der beiden kompletten Datensätze ergab, dass insgesamt 43 Proteine in beiden Screening-Methoden entdeckt werden konnten (Abbildung 10, Tabelle 27 sowie digitaler Anhang).

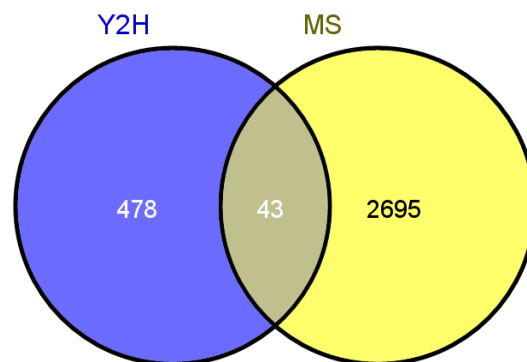


Abbildung 10: Vergleich der Y2H und SILAC-AP-MS Datensätze. Insgesamt 43 Proteine wurden mit beiden Methoden identifiziert.

Tabelle 27: Mit beiden Screening-Methoden identifizierte Proteine. Aufgelistet sind 24 von 43 Proteinen, die mit beiden Screening-Methoden identifiziert wurden. Dargestellt ist der jeweilige Gen-Name, die H/L Ratio in den jeweiligen SILAC-AP-MS Screens und die Y2H-Score mit Vermerk in welchem Y2H-Screen das Protein bzw. Gen identifiziert wurde. Nicht angereicherte Proteine sind dunkelgrau, leicht angereicherte hellgrau und signifikant angereicherte sind grün hinterlegt. Abk. M1, M2 und M3: H/L Ratios der SILAC-AP-MS MuRF1, 2 und 3 Screens, NA: Nicht angereichert, jedoch Peptide in der MS identifiziert; Fp: Falsch-positiv.

Gen-Name	M1 Screen 1	M1 Screen 2	M2 Screen 1	M2 Screen 2	M3 Screen 1	M3 Screen 2	Gen-Name	Y2H-Score	Y2H-Screen
BRD4	0,94	0,90	0,84	0,81	0,96	0,43	BRD4	0,7	MuRF1, 2
EIF2C2	NA	1,85	NA	1,32	NA	NA	EIF2C2	0,46	MuRF1, 2
PKM2	1,01	1,10	0,95	0,84	NA	0,29	PKM2	0,7	MuRF1, 2
PLXNA3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	PLXNA3	0,56	MuRF1, 2
PRKACA	1,73	1,68	NA	1,48	NA	NA	PRKACA	0,6	MuRF1, 2
RPS4X	0,73	0,95	0,70	1,02	1,87	0,45	RPS4X	0,66	MuRF1, 2
SEC23B	NA	NA	NA	NA	NA	NA	SEC23B	0,46	MuRF1, 2
TSC22D4	NA	NA	0,91	NA	NA	NA	TSC22D4	0,73	MuRF1, 2
WDR42A	1,56	1,70	1,35	1,67	1,30	NA	WDR42A	0,67	MuRF3
VCP	1,51	1,46	0,92	1,16	NA	NA	VCP	0,67	MuRF3
RBM15B	0,78	0,90	1,08	0,99	NA	NA	RBM15B	0,67	MuRF3
MICAL2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	MICAL2	0,50	MuRF3
PRMT5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	PRMT5	0,41	MuRF3
PABPC3	NA	NA	NA	NA	1,24	2,36	PABPC3	0,33	MuRF3
DVL3	1,03	0,98	1,53	1,28	1,65	NA	DVL3	0,33	MuRF3
PRDX5	NA	NA	2,00	NA	NA	NA	PRDX5	0,83	MuRF3 Fp
RPL27A	1,14	1,12	1,09	1,06	1,23	0,30	RPL27A	0,83	MuRF3 Fp
SNX18	1,38	1,20	0,94	NA	NA	NA	SNX18	0,67	MuRF3 Fp
NEDD8	1,12	2,19	0,92	0,93	NA	NA	NEDD8	0,50	MuRF3 Fp
ADSS	1,52	1,26	NA	1,54	NA	NA	ADSS	0,58	MuRF3 Fp
ZNF655	0,82	0,63	0,80	0,93	NA	0,61	ZNF655	0,25	MuRF3 Fp
HNRPLL	27,25	1,87	20,69	20,11	NA	NA	HNRPLL	0,25	MuRF3 Fp
DYNLL1	1,06	1,09	1,21	1,32	1,48	0,51	DYNLL1	0,83	MuRF3cc
DAXX	0,86	0,97	1,00	1,10	0,92	0,85	DAXX	0,33	MuRF3cc

Nachdem 43 Proteine in beiden Screens identifiziert wurden, sollte überprüft werden welche von diesen Proteinen sowohl in den SILAC-AP-MS Screens stark angereichert als auch gleichzeitig in den Y2H-Screens hohe Y2H-Scores aufwiesen. Dies traf nur auf wenige der Proteine im vollen Maße zu. Zwei Proteine, die dahingehend besonders auffielen, waren *WD repeat-containing protein 42A* (WDR42A) und *Valosin-containing protein* (VCP), da beide hohe Anreicherungen/Scores in beiden Screens aufwiesen (Tabelle 27). Weitere Proteine, die in SILAC-AP-MS stark angereichert und gleichzeitig hohe Y2H-Scores aufwiesen, waren *cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit alpha* (PRKACA), *40S ribosomal protein S4, X isoform* (RPS4X) und *Dynein light chain 1, cytoplasmic* (DYNLL1). Die meisten anderen der 43 identifizierten Proteine wiesen einerseits hohe Y2H-Scores auf und waren aber andererseits nur schwach oder gar nicht (NA) in der SILAC-AP-MS angereichert (z.B. *Bromodomain-containing protein 4* (BRD4), *Pyruvate kinase muscle* (PKM2) und *Sorting nexin-18* (SNX18). Zusätzlich waren andersherum einige Proteine signifikant in der SILAC-AP-MS angereichert, wurden jedoch im Y2H mit einer schwachen Y2H-Score identifiziert oder im Vorhinein als höchstwahrscheinlich falsch-positiv (Abschnitt 3.1.1) bewertet (z.B. *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like* (HNRPLL), *neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 8* (NEDD8), *Peroxiredoxin-5* (PRDX5) und *dishevelled, dsh homolog 3* (DVL3). Zusätzlich wiesen manche Proteine schlechte Anreicherungen/Scores in beiden Screening Methoden auf (z.B. *Protein arginine N-methyltransferase 5* (PRMT5), *Protein transport protein Sec23B* (SEC23B) und *Eukaryotic translation initiation factor 2C2* (EIF2C2).

3.1.4 Bestätigung ausgewählter Y2H und SILAC-AP-MS identifizierter MuRF Protein-Protein Interaktionen mittels Ko-Immunpräzipitation

Zur Verifizierung einiger der durch Y2H und SILAC-AP-MS neu identifizierten MuRF Protein-Protein Interaktionen (PPI) wurden Ko-Immunpräzipitationen (Ko-IPs) durchgeführt. Die getesteten Proteine und die Ergebnisse der Ko-IP Experimente sind in Tabelle 28 zusammengefasst. Die spezifische Selektion der in Tabelle 28 aufgelisteten Proteine wird im Abschnitt 4.1.3 detailliert diskutiert.

Tabelle 28: Zusammenfassung der Ko-IP-Ergebnisse. N.d. Nicht durchführbar, bedeutet der entsprechende Klon zeigte keine Expression in COS-7-Zellen oder war fehlerhaft. MuRF positiv, legt dar mit welchen MuRF-Familienmitgliedern die Interaktionspartner Ko-IP positiv sind.

Name	Symbol	FLAG Ko-IP	MuRF positiv
Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 1	TNFAIP1	Negativ	
DDB1 and CUL4 associated factor 8 (DCAF8)	WDR42A	Positiv	1 und 3
Ubiquitin specific peptidase 35	USP35	Positiv	1, 2 und 3
Myosin light chain kinase 2	MYLK2	Positiv	1, 2 und 3
Valosin-containing protein	VCP	Negativ	
Histone deacetylase 10	HDAC10	Positiv	3
Dual specificity phosphatase 16	DUSP16	Negativ	
F-box and WD repeat domain containing 2	FBXW2	Positiv	3
G2/M-phase specific E3 ubiquitin ligase	G2E3	Negativ	
Titin-cap (telethonin)	TCAP	Negativ	
Ubiquitin-conjugating enzyme E2I	UBE2I	Negativ	
Ubiquitin specific peptidase 13	USP13	Positiv	1 und 2
Calpain 3, (p94)	CAPN3	Positiv	1 und 3
DDB1 and CUL4 associated factor 11	WDR23	N.d.	
Insulin-like growth factor 2	IGF2	N.d.	
Ubiquitin-conjugating enzyme E2E3	UBE2E3	Positiv	3
Ubiquitin carboxyl-terminal esterase L3	UCHL3	N.d.	
RELT tumor necrosis factor receptor	RELT	Negativ	
Interleukin 18 receptor accessory protein	IL18RAP	N.d.	
Toll-like receptor 10	TLR10	Negativ	
Serum deprivation response	SDPR	Negativ	
Protocadherin gamma subfamily B, 1	PCDHGB1	Positiv	3
EPH receptor B2	EPHB2	Positiv	3
Integrin, alpha E	ITGAE	Negativ	
Integrin beta 3 binding protein	ITGB3BP	Negativ	
Integrin, beta 5	ITGB5	Positiv	1
Bobby sox homolog	BBX	Negativ	

Die Ko-IPs wurden mit Myc/6xHis markierten MuRF-Proteinen und FLAG markierten potentiellen Interaktionspartnern durchgeführt. Nach der Proteinsynthese in COS-7-Zellen wurde eine Immunpräzipitation der FLAG-Iap über eine FLAG-Agarose-Säule durchgeführt. Eine PPI konnte nachgewiesen werden sofern die MuRF-Proteine mit dem Bindungspartner ko-präzipitiert wurden. Als Negativkontrolle wurde überprüft ob Myc/6xHis markierte MuRF-Proteine auch ohne einen Interaktionspartner, also unspezifisch, an die FLAG-Agarose binden können. In diesen Negativkontrollen konnte gezeigt werden, dass alle MuRFs nicht unspezifisch an die FLAG-Agarose-Säule binden (Abbildung 11 und 12). Wurden in den Ko-IP Experimenten die MuRFs ko-präzipitiert, stellte dies somit eine spezifische Interaktion und nicht eine unspezifische Bindung der Myc/6xHis markierten MuRFs an die FLAG-Agarose dar.

Von den 27 getesteten Proteinen konnte mit elf Proteinen eine Interaktion mit einem oder mehreren MuRF-Familienmitgliedern nachgewiesen werden (Tabelle 28). Die reproduzierbarsten MuRF-Interaktoren wurden mit *WD repeat-containing protein 42A* (WDR42A), *Ubiquitin specific peptidase 35* (USP35), *Myosin light chain kinase 2* (MYLK2), *Histone deacetylase 10* (HDAC10) und *F-box and WD repeat domain containing 2* (FBXW2) identifiziert. Diese Proteine wiesen zusätzlich die eindeutigsten MuRF Ko-Präzipitationen in den Ko-IP Experimenten (Abbildung 11 und 12) auf. Mit *Calpain 3* (CAPN3) und *Ubiquitin-conjugating enzyme E2E3* (UBE2E3) wurden zwei weitere Proteine gefunden, die jedoch nicht in allen Ko-IP Versuchen eindeutig positiv waren. Zusätzlich konnten Bindungen zwischen MuRF3 und *Protocadherin gamma subfamily B1* (PCDHGB1) sowie *EPH receptor B2* (EPHB2) und eine Interaktion zwischen MuRF1 und *Integrin beta 5* (ITGB5) nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

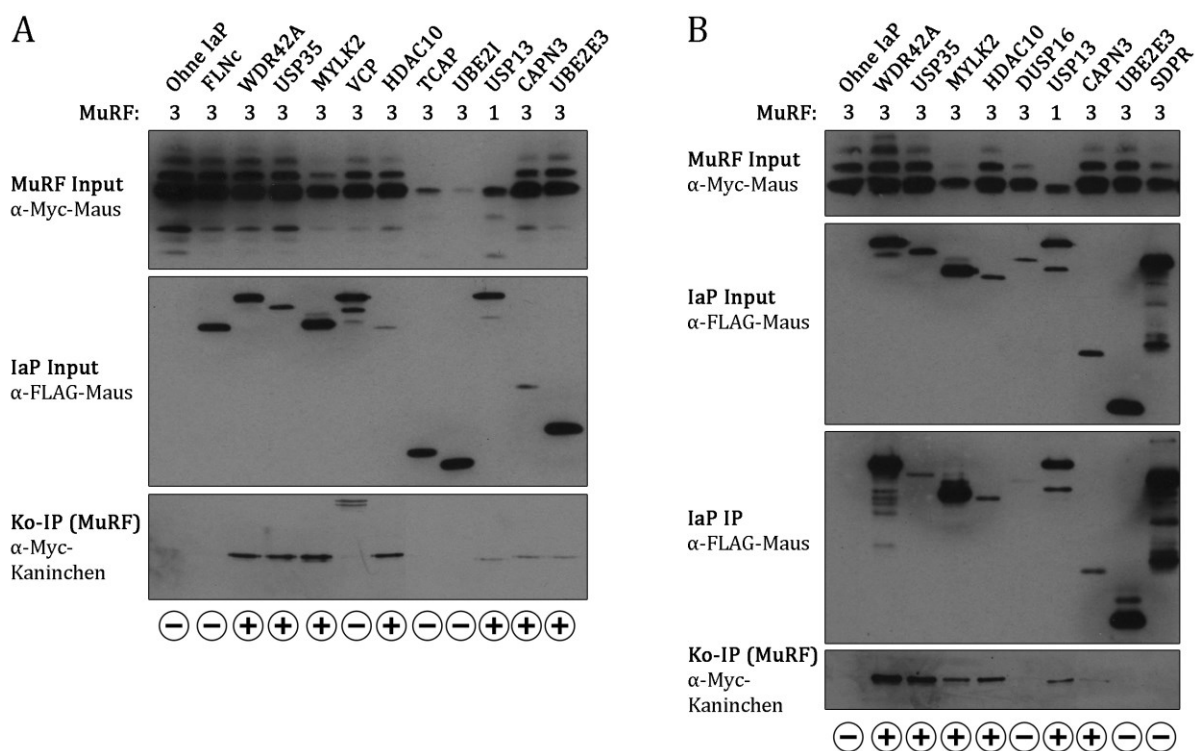


Abbildung 11: MuRF Ko-IP Ergebnisse (1). Synthese von Myc/6xHis markierten MuRFs und FLAG markierten Interaktionspartnern in COS-7-Zellen. Immunpräzipitation der IAP über FLAG-Agarose. Immunblotting der MuRFs und IAP vor (Input) und nach der Ko-IP. Detektion der MuRFs im IB über α-Myc (Input: Maus, Ko-IP: Kaninchen) und der IAP über α-FLAG (Input: Maus, Ko-IP: Kaninchen). Die MuRFs binden nicht unspezifisch an die FLAG-Agarose wie in Spalte „Ohne IAP“ in A und B und Abbildung 12 A und B zu sehen ist. Die Negativkontrolle ist somit negativ. MuRFs konnten in einigen Ko-IPs ko-präzipitiert werden (wie z.B. mit WDR42A, USP35 und MYLK2). Andererseits konnten in anderen Ko-IPs die MuRFs nicht ko-präzipitiert werden (z.B. mit VCP, DUSP16, SDPR).

Die bereits als MuRF-IAP beschriebenen und in den Screens identifizierten Proteine TCAP, UBE2I, und USP13 wurden ebenfalls auf Interaktion mit MuRF-Proteinen getestet. TCAP wurde als MuRF1 und 2 spezifischer Bindungspartner beschrieben [45]. Des

Weiteren konnte TCAP außerdem zusätzlich in den Y2H-Screens mit volle Länge MuRF3 und MuRF3-Cc-AR identifiziert werden. Eine MuRF3-TCAP Assoziation konnte jedoch in den Ko-IP Experimenten nicht bestätigt werden. USP13 wurde ebenfalls als MuRF1 und 2 wechselwirkendes Protein beschrieben [35]. In den durchgeführten Ko-IP Experimenten konnte die Interaktion mit MuRF1 und 2 jedoch nicht mit MuRF3 bestätigt werden (Abbildung 11 und 12).

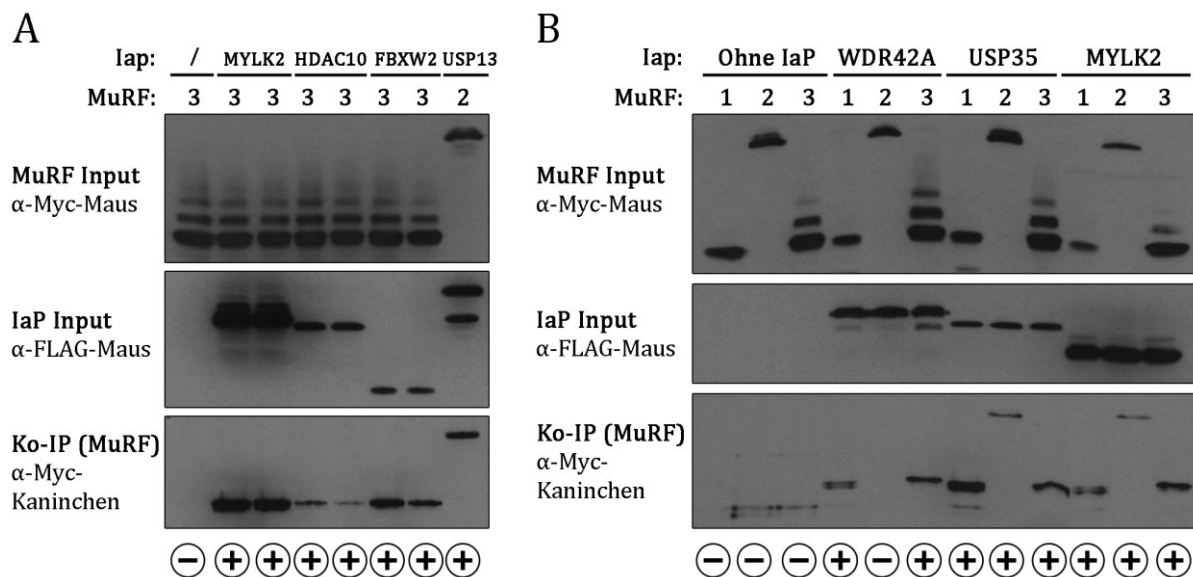


Abbildung 12: MuRF Ko-IP Ergebnisse (2). Durchführung und Immunblotting wie in Abbildung 11 beschrieben. (A) Zur Bestätigung vorangegangener Ko-IP Ergebnisse wurden einige Ergebnisse mehrmals wiederholt. Die MuRFs konnten mit einigen neuen IaP wiederholt ko-präzipitiert werden. In (A) zu sehen mit MYLK2, HDAC10 und FBXW2. (B) Ausgewählte IaP wurden zusätzlich auf Interaktion mit anderen MuRF Familienmitgliedern getestet. WDR42A interagiert spezifisch mit MuRF1 und 3. USP13 und MYLK2 interagieren mit allen MuRF-Familienmitgliedern.

WDR42A wurde in den Y2H-Screens mit MuRF3 und in den SILAC-AP-MS Experimenten mit MuRF1 und 2 als putativer MuRF-IaP identifiziert. In den Ko-IP Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass WDR42A spezifisch mit MuRF1 und 3 interagiert (Abbildung 12). MYLK2 wurde mit MuRF3 im Y2H als putativer MuRF-IaP entdeckt. Eine Interaktion konnte auch mit allen anderen MuRFs in der Ko-IP nachgewiesen werden (Abbildung 12). USP35 wurde als MuRF3-IaP gefunden. Zusätzlich zeigten die Ko-IP Experimente eine Wechselwirkung mit allen anderen MuRF-Familienmitgliedern (Abbildung 12). Somit konnten mithilfe der Ko-IP Experimente elf der in den Y2H- und SILAC-AP-MS Screens identifizierten MuRF Protein-Protein Interaktionen bestätigt werden.

3.2 Charakterisierung ausgewählter MuRF-Interaktionen

3.2.1 Cycloheximid-Abbau-Experimente geben Hinweise auf die funktionelle Bedeutung der neu identifizierten MuRF-PPI

Nachdem wie in Abschnitt 3.1.4 dargestellt elf neue MuRF-Interaktionspartner identifiziert wurden, sollte anschließend die Funktion einiger dieser Protein-Protein Interaktionen (PPI) näher untersucht werden. Da die MuRFs den UPS-abhängigen Abbau von muskulären Proteinen vermitteln, wurde als erstes mit Cycloheximid-Abbau-Experimenten untersucht ob die gemeinsame Synthese der MuRFs mit den neuen Bindungspartnern zu einer verminderten Stabilität der Interaktionspartner führt. Das Ziel dieser Experimente war es somit zu untersuchen, ob die neuen MuRF-lap Substrat-Proteine sein könnten. Da in dieser Arbeit primär Interaktionen charakterisiert werden sollten, die einen Einfluss auf die Assemblierung oder Regulation von MuRF-Multiproteinkomplexen haben, sollten mit den folgenden Experimenten zunächst potentielle MuRF-Substrate identifiziert werden, um diese für weitere funktionelle Charakterisierungen auszuschließen. Hierfür wurde mit Cycloheximid-Abbau-Experimenten die Halbwertszeit der MuRFs und der Interaktionspartner untersucht. Cycloheximid (CHX) inhibiert die Proteinbiosynthese wodurch der Abbau von Proteinen über einen bestimmten Zeitraum analysiert werden kann. Beispielsweise sollte die Ko-Expression der MuRFs mit einem Substrat-Protein dessen Stabilität im CHX-Experiment verringern, da das Substrat einerseits nicht mehr hergestellt wird und andererseits verstärkt abgebaut werden sollte.

In CHX-Abbau-Experimenten wurde beobachtet, dass MuRF-Proteine und WDR42A über einen Zeitraum von bis zu 4 h stabil sind (Abbildung 13 A). Die Stabilität dieser Proteine veränderte sich auch nicht durch die gleichzeitige Synthese beider Proteine (Abbildung 13 B). Somit scheint keines der Proteine die Stabilität des jeweiligen Interaktionspartners über einen Zeitraum von 4 h zu beeinflussen.

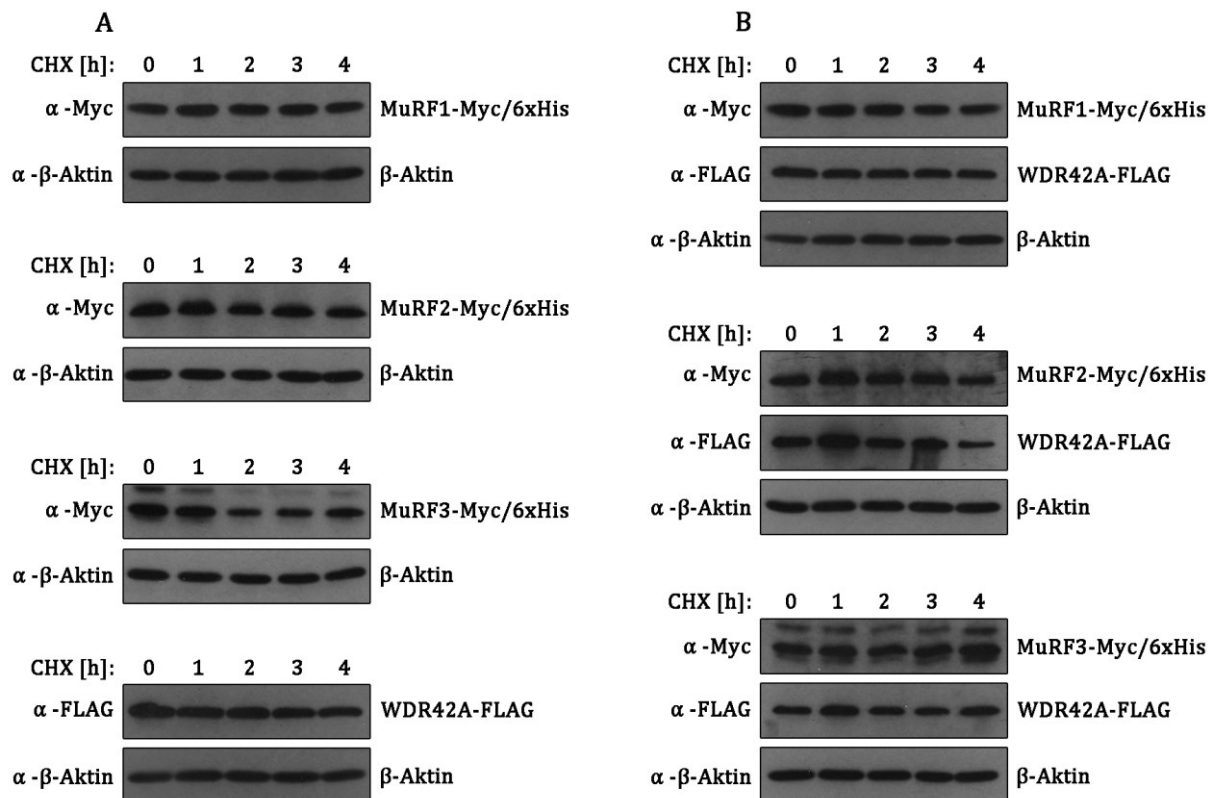


Abbildung 13: Cycloheximid-Abbau-Experimente in COS-7-Zellen mit MuRFs und WDR42A. Myc/6xHis markierte MuRFs und FLAG markiertes WDR42A wurden in COS-7-Zellen alleine (A) oder zusammen (B) für 24 h überexprimiert. Die Protein-Neu-Synthese wurde nach 24 h durch CHX gestoppt. Die Zellen wurden 0, 1, 2, 3 und 4 h lang mit 100 µg/ml CHX behandelt. Anschließend wurden äquivalente Zellmengen aufgeschlossen und das Totallysat mittels Immunblotting analysiert. Die MuRFs wurden mit α-Myc (Maus) und WDR42A mit α-FLAG (Maus) detektiert. Alle MuRFs und WDR42A alleine (A) sowie zusammen synthetisiert (B) waren über den getesteten Zeitraum stabil.

Die Muskel-spezifische Kinase MYLK2 ist wie die MuRFs über einen Zeitraum von 4 h stabil (Abbildung 14 A). Die Ko-Expression von MYLK2 mit MuRF1 führte jedoch zu einer drastischen Reduktion der MuRF1 Stabilität (Abbildung 14 B). Diese Beobachtungen wurden ausschließlich mit MuRF1 jedoch nicht mit MuRF2 oder 3 (Abbildung 14 B) gemacht. Des Weiteren wurde überprüft ob der in COS-7-Zellen beobachtete Abbau-Effekt Proteasom-abhängig ist. Dazu wurden die Experimente wie in Abbildung 14 dargestellt wiederholt und die Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 behandelt. In diesen Experimenten konnte nicht eindeutig gezeigt werden, dass der MYLK2 MuRF1 Abbau-Effekt Proteasom-abhängig ist (Daten nicht gezeigt).

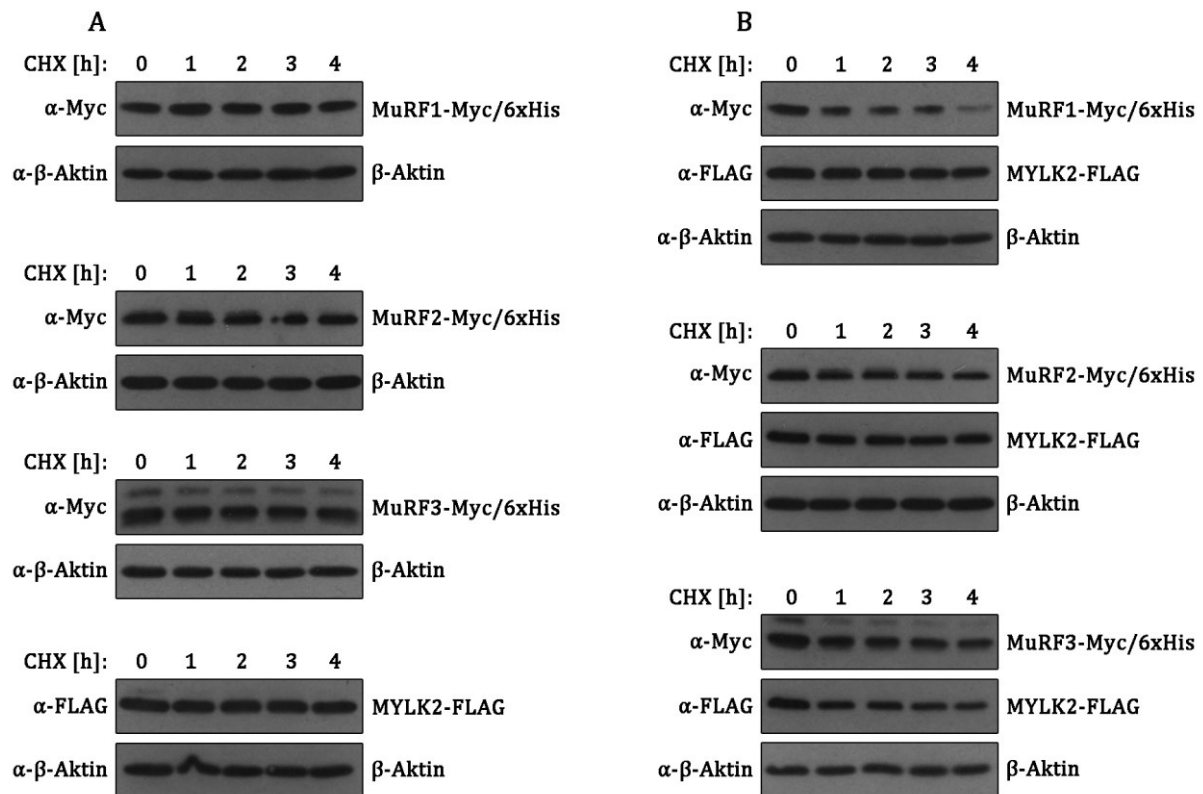


Abbildung 14: Cycloheximid-Abbau-Experimente mit MuRFs und MYLK2 in COS-7-Zellen. Durchführung und Aufbau der CHX-Abbau-Experimente wie in Abbildung 13 beschrieben. Die MuRFs als auch MYLK2 (A) waren über den getesteten Zeitraum stabil. Die Ko-Expression von MuRF1 mit MYLK2 (B) führte hingegen zu einer drastischen Herabsetzung der MuRF1 Stabilität. Dieser Effekt wurde mit MuRF1 jedoch nicht mit MuRF2 oder 3 beobachtet (B).

In weiteren CHX-Abbau-Experimenten konnte gezeigt werden, dass MuRF1 die Stabilität von HDAC10 und USP35 reduziert (Abbildung 15 A und B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HDAC10 und USP35 potentielle MuRF1-Substrate sind.

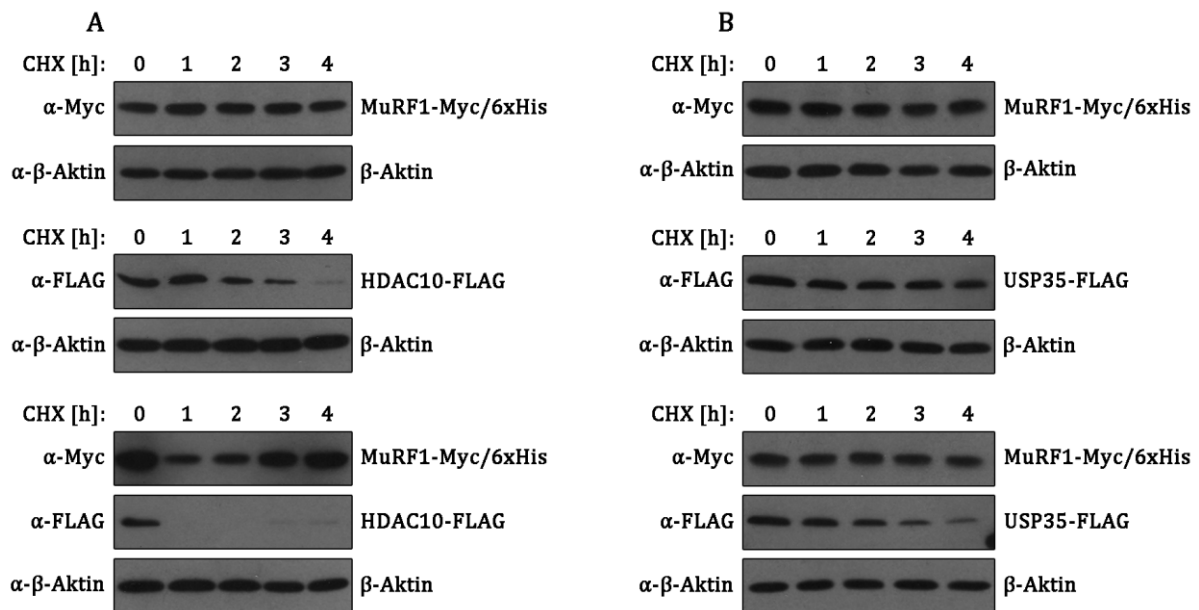


Abbildung 15: Cycloheximid-Abbau-Experimente mit MuRF1 und HDAC10 sowie USP35. Durchführung und Aufbau der CHX-Abbau-Experimente wie in Abbildung 13 dargestellt. (A) MuRF1 ist über 4 h stabil. HDAC10 alleine zeigt einen eindeutigen Abbau-Effekt der wiederum durch Ko-Expression von MuRF1 um ein vielfaches verstärkt wird. (B) MuRF1 und USP35 sind über einen Zeitraum von 4 h stabil. Die Ko-Expression von MuRF1 vermindert die USP35 Stabilität merklich.

Zusammenfassend konnte mit WDR42A ein MuRF-Interaktionspartner identifiziert werden dessen Stabilität nicht durch die MuRFs beeinflusst wird. Mit HDAC10 und USP35 wurden zusätzlich zwei Bindungspartner entdeckt, die neue MuRF1-Substrate sein könnten und mit MYLK2 ein Interaktionspartner, der spezifisch die MuRF1-Stabilität beeinflusst.

Nachdem durch CHX-Abbau-Experimente erste Hinweise auf die funktionelle Bedeutung einiger der MuRF-PPI erlangt werden konnten, sollten als nächstes ausgesuchte Wechselwirkungen ausführlicher charakterisiert werden. Im Folgenden wurden drei Interaktionen weitergehend untersucht: 1. MuRF-MuRF, 2. MuRF1-MYLK2 und 3. MuRF1-WDR42A

3.2.2 Charakterisierung von MuRF-MuRF Interaktionen

In den SILAC-AP-MS Screens (Abschnitt 3.1.2) konnte mit MuRF1 auch MuRF2 als Interaktionspartner identifiziert werden. In früheren Publikationen konnte bereits eine Homo- und Heterodimerisierung der MuRFs gezeigt werden [34]. Diese MuRF-MuRF Interaktionen wurden bisher lediglich in *in vitro* Bindungsstudien nachgewiesen. Zusätzlich ist die funktionelle Relevanz der MuRF-MuRF Interaktionen unklar. Zunächst sollte die Fähigkeit der MuRFs zur Bildung von Heterodimeren bzw. Heterooligomeren

getestet werden. Dafür wurden Myc/6xHis und FLAG markierte MuRFs in COS-7 Zellen synthetisiert und Ko-IPs durchgeführt. Die postulierten MuRF-MuRF Interaktionen konnten so zum ersten Mal mit eukaryotisch hergestellten MuRF-Proteinen gezeigt werden (Abbildung 16).

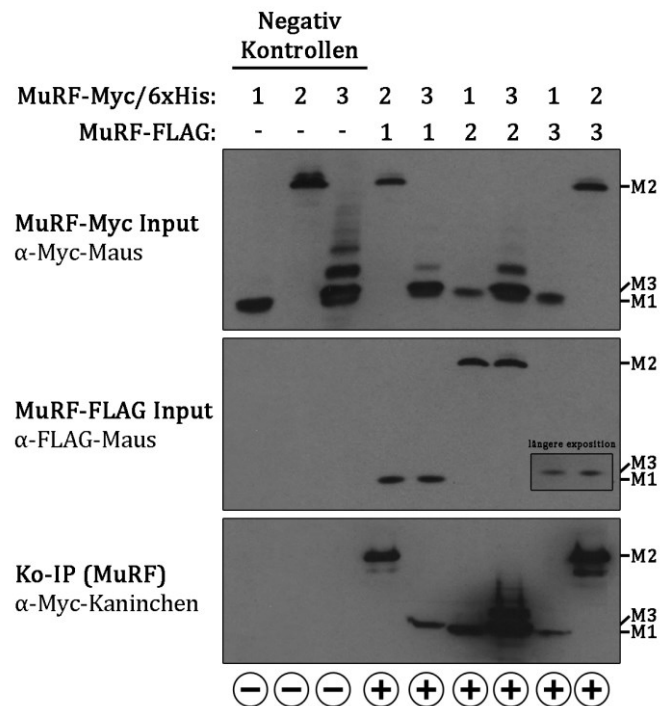


Abbildung 16: Bestätigung der MuRF-MuRF Interaktionen mittels Ko-Immunpräzipitationen. Myc/6xHis (pcDNA3.1(-)) und FLAG (pcDNA3.1(-)FLAG) markierte MuRFs wurden in COS-7 Zellen synthetisiert. Anschließend wurden die Ko-IPs mit FLAG-M2-Agarose durchgeführt. MuRF2 und 3 konnten mit MuRF1 ko-präzipitiert werden. MuRF1 und 3 mit MuRF2 sowie MuRF1 und 2 mit MuRF3 ko-präzipitiert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass alle MuRFs mit allen MuRFs interagieren. Des Weiteren ist in der Abbildung zu sehen, dass die Negativkontrollen negativ sind, da Myc/6xHis markierte MuRFs nicht unspezifisch an die FLAG-M2-Agarose binden. Abk. M1: MuRF1, M2: MuRF2, M3: MuRF3.

Zur Validierung der Ko-IP Ergebnisse sowie zur Untersuchung ob MuRF Ko-Expressionen einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation der individuellen MuRFs haben, wurden Kolokalisationsstudien mit GFP bzw. RFP markierten MuRFs in Muskelzellen durchgeführt. Zunächst wurde überprüft ob die Position der verwendeten Protein-Tags einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation der MuRFs hat. Hierfür

wurden die MuRFs als N- oder C-terminal GFP (pZsGreen) und/oder RFP (pmCherry) markierte Fusionsproteine in H9c2 Zellen synthetisiert¹.

Sowohl N- als auch C-terminal GFP markiertes MuRF1 war in kleinen punktförmigen Strukturen im Zytosol lokalisiert (Abbildung 17). Somit scheint die Position des Protein-Tags keinen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung von MuRF1 zu haben. Dem hingegen konnte für MuRF2 ein Unterschied bezüglich der Position des verwendeten RFP-Tags beobachtet werden. MuRF2, das mit einem N-terminalen RFP-Tag hergestellt wurde, zeigte zytosolische punktförmige Strukturen (Abbildung 18). Wird MuRF2 jedoch mit einem C-terminalem RFP-Tag synthetisiert, wurden eher flächige filamentöse Geflechte, die teilweise an die subzelluläre Verteilung von MuRF3 erinnern beobachtet (Abbildung 19 A). Da MuRF2 und MuRF3 an Mikrotubuli lokalisieren [32, 36, 38], kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Strukturen ebenfalls um Mikrotubuli handelt. Außerdem konnte C-terminal RFP markiertes MuRF2 in bis hierhin nicht beschriebenen kleinen zytosolischen kreisförmigen Strukturen beobachtet werden (Abbildung 19 B und C). Dem hingegen lokalisiert MuRF3 in großen flächigen Aggregaten als N-terminal RFP versehenes Protein (Abbildung 20). Wird MuRF3 andererseits als C-terminal markiertes Protein hergestellt, lokalisiert es an filamentösen Geflechten (Abbildung 20). Da MuRF3 bereits als Mikrotubuli bindendes Protein charakterisiert wurde, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen Strukturen ebenfalls um Mikrotubuli handelt.

¹ **Terminologie der verwendeten GFP und RFP Vektoren:** In pZsGreen-N1 Vektoren einklonierte Gene führen letztendlich zur Synthese von Proteinen, die einen C-terminalen GFP-Tag besitzen. Die Terminologie des Vektor Herstellers ist somit also genau Gegenteil. Die Expression führt laut Hersteller zu einem GFP, welches selbst ein N-terminal markiertes Protein besitzt (deswegen -N1). Dies lässt sich analog auch auf pZsGreen-C1 sowie pmCherry-N1 sowie -C1 übertragen. In den aufgeführten Abbildungen sowie im Text wird die Position des Tags (N- oder C-terminal) von dem GOI wie z.B. MuRF1 ausgehend beschrieben.

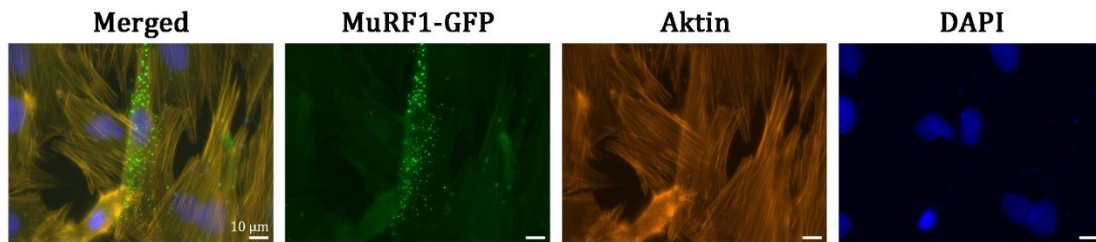


Abbildung 17: Lokalisierung von C-terminal GFP markiertem MuRF1 in H9c2 Zellen. H9c2 Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 70-80% kultiviert, mit pZsGreen-N1-MuRF1 transfiziert und die Expression für 24 h durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und das Aktinzytoskelett mit TRITC-Phalloidin angefärbt sowie die DNA im Zellkern mit DAPI visualisiert. Das synthetisierte MuRF1 lokalisiert in kleinen punktierten Strukturen, die fast ausschließlich im Zytosol der Zellen zu finden sind. Parallel durchgeführte Versuche mit pZsGreen-C1-MuRF1 zeigten die gleichen Resultate (Daten nicht gezeigt).

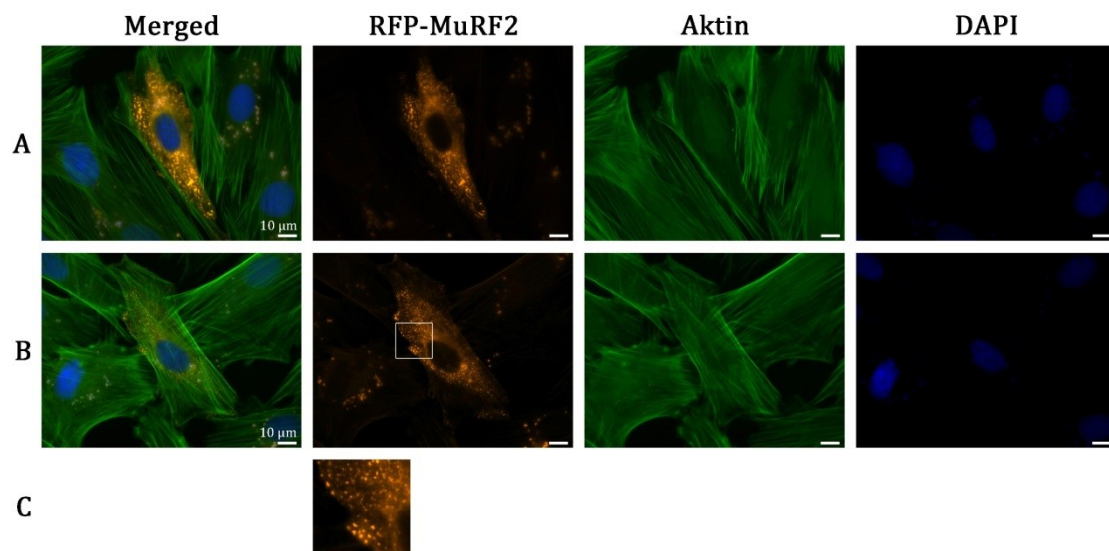


Abbildung 18: Lokalisierung von N-terminal RFP markiertem MuRF2 in H9c2 Zellen. H9c2 Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert, mit pmCherry-C1-MuRF2 transfiziert und die Expression für 24 h durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und das Aktinzytoskelett mit FITC-Phalloidin angefärbt sowie die DNA im Zellkern mit DAPI visualisiert. (A und B) N-terminal RFP markiertes MuRF2 lokalisiert in kleinen punktförmigen Strukturen, welche eine ubiquitäre Verteilung im Zytosol aufweisen. (C) Detailausschnitt von (B).

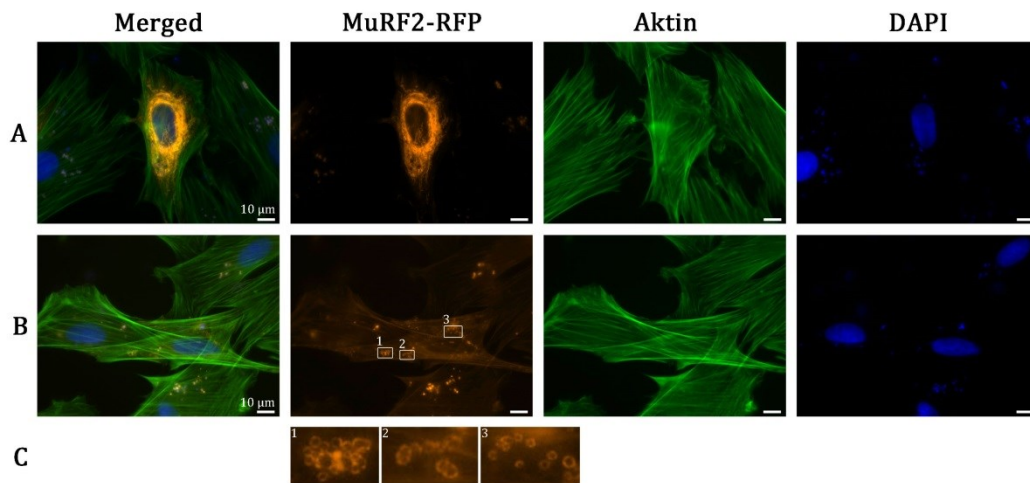


Abbildung 19: Lokalisierung von C-terminal RFP markiertem MuRF2 in H9c2 Zellen. H9c2 Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert, mit pmCherry-N1-MuRF2 transfiziert und die Expression für 24 h durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und das Aktinzytoskelett mit FITC-Phalloidin angefärbt sowie die DNA im Zellkern mit DAPI visualisiert. C-terminal RFP markiertes MuRF2 weist zum einen eine Lokalisierung in flächigen, um den Zellkern verteilten filamentösen Strukturen (A) als auch in kleinen kreisförmigen Strukturen (B und C) auf.

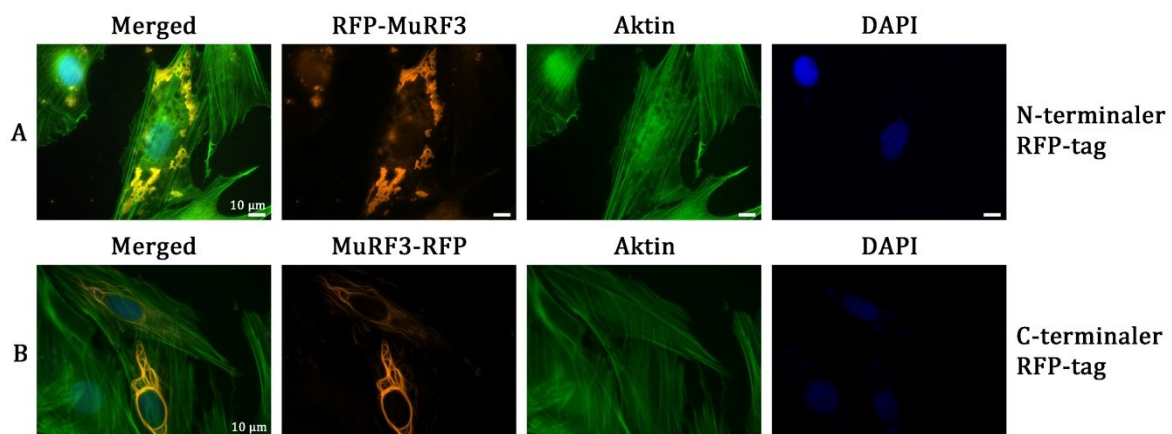


Abbildung 20: Lokalisierung von N- und C-terminal RFP markiertem MuRF3 in H9c2 Zellen. H9c2 Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert, mit pmCherry-C1-MuRF3 sowie pmCherry-N1-MuRF3 transfiziert und die Expression für 24 h durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und das Aktinzytoskelett mit FITC- bzw. TRITC-Phalloidin angefärbt sowie die DNA im Zellkern mit DAPI visualisiert. N-terminal RFP markiertes MuRF3 (A) lokalisiert in großen Aggregaten, die meist in der Zellperipherie angesiedelt sind. Dem hingegen lokalisiert C-terminal markiertes MuRF3 (B) in filamentösen Geflechten, die meist die ganzen Zellen durchziehen, welche jedoch nicht im Zellkern lokalisieren.

Als nächstes wurde untersucht ob die gemeinsame Synthese der MuRFs zu einer veränderten subzellulären Verteilung der individuellen MuRF-Proteine führt. Diese Experimente zeigten, dass MuRF1 und 2 in filamentösen und kreisförmigen Strukturen kolokalisieren (Abbildung 21). MuRF1 alleine hergestellt lokalisiert ubiquitär im Zellzytosol in kleinen punktförmigen Strukturen. Dies zeigt, dass MuRF1 an MuRF2 Lokalisationen rekrutiert wird und mit MuRF2 an diesen kolokalisiert. Ähnliche Beobachtungen wurden mit MuRF1 und 3 gemacht. MuRF1 scheint an Mikrotubuli

bindendes MuRF3 rekrutiert zu werden (Abbildung 22). Jedoch ist die Kolokalisation der beiden Proteine nicht vollständig. MuRF1 lokalisiert weiterhin in kleinen punktförmigen Strukturen, die jedoch nicht mehr ubiquitär im Zytosol verteilt sind. Dies wird besonders deutlich durch einen direkten Vergleich von einzeln hergestelltem MuRF1, mit MuRF1 welches MuRF3 ko-exprimiert (Abbildung 23). Die Bindung von MuRF1 an MuRF3 führt zu einer Lokalisation von MuRF1 an Mikrotubuli bindendes MuRF3. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass MuRF2 und 3 eindeutig an Mikrotubuli kolokalisieren (Abbildung 24).

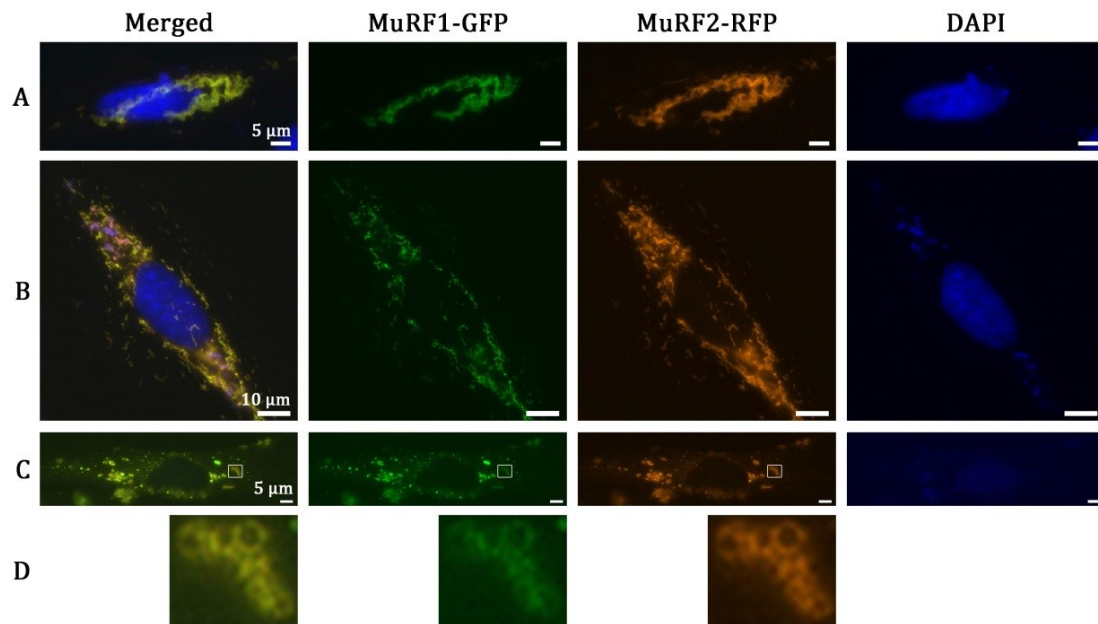


Abbildung 21: Kolokalisierung von MuRF1 und 2 in H9c2 Zellen. H9c2 Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert, mit pZsGreen-N1-MuRF1 sowie pmCherry-N1-MuRF2 transfiziert und die Expression für 24 h durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und die DNA im Zellkern mit DAPI angefärbt. MuRF1 und 2 kolokalisieren in H9c2 Zellen in fädigen (A und B) als auch in kleinen kreisartigen (C und D) Strukturen.

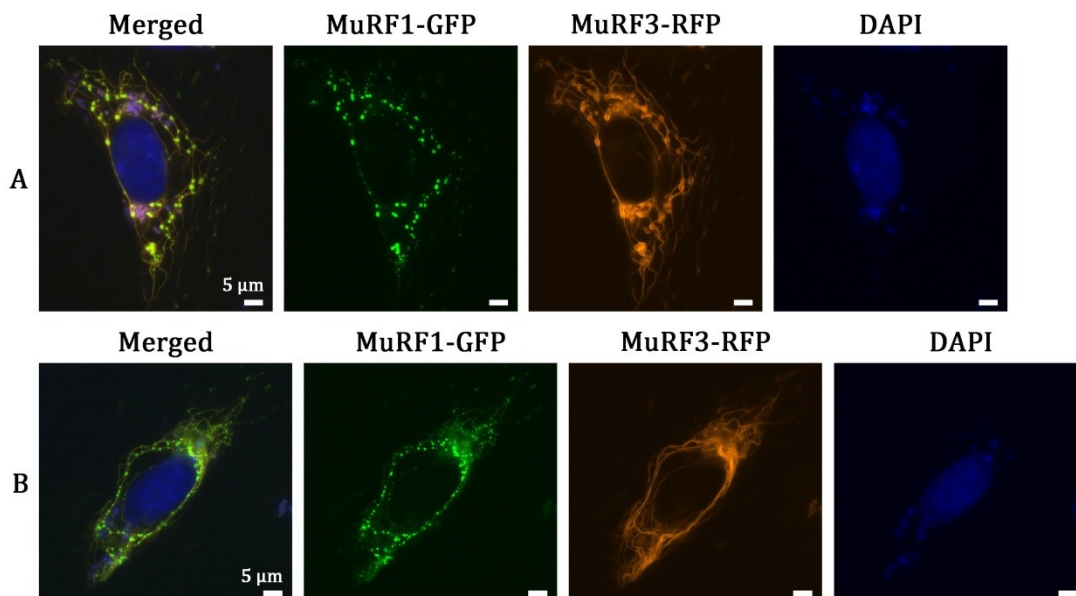


Abbildung 22: Kolokalisierung von MuRF1 und 3 in H9c2 Zellen. H9c2 Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert, mit pZsGreen-N1-MuRF1 sowie pmCherry-N1-MuRF3 transfiziert und die Expression für 24 h durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und die DNA im Zellkern mit DAPI angefärbt. MuRF3 lokalisiert wie bereits beschrieben an filamentösen Strukturen. MuRF1, welches alleine betrachtet eine ubiquitäre Verteilung in kleinen punktförmigen Strukturen in der Zelle aufweist, kolokalisiert mit MuRF3 an diesen filamentösen Geflechten.

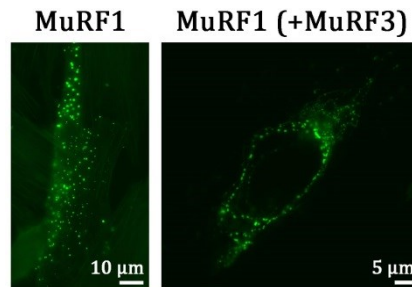


Abbildung 23: Vergleich der MuRF1 Lokalisation ohne und mit MuRF3 Ko-Expression. Wenn MuRF1 in H9c2 Zellen alleine überexprimiert wird, zeigt es eine ubiquitäre Verteilung in kleinen punktförmigen Strukturen im Zytosol der Zellen. Durch die Ko-Expression von MuRF3 kommt es zu einer Translokation von MuRF1 an Mikrotubuli assoziiertes MuRF3, als Konsequenz einer Heterooligomerisierung von MuRF1 mit MuRF3.

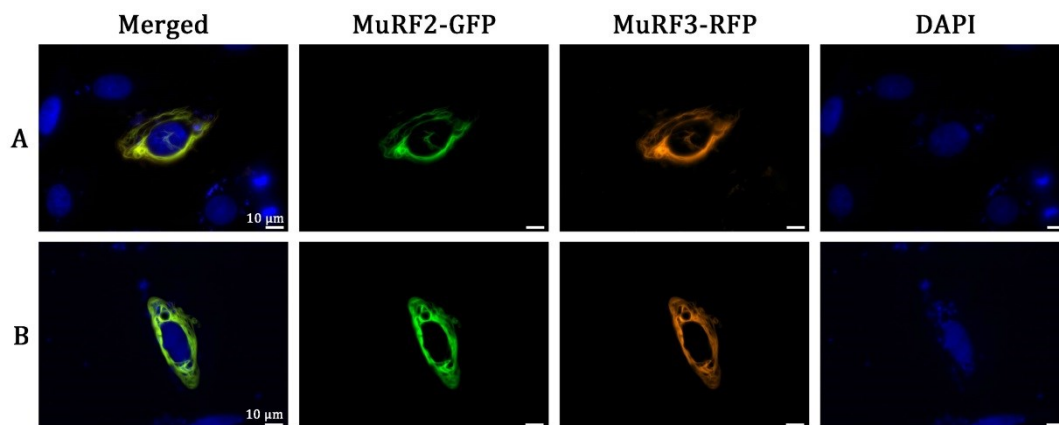


Abbildung 24: Kolokalisierung von MuRF2 und 3 in H9c2 Zellen. H9c2 Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert, mit pZsGreen-N1-MuRF2 sowie pmCherry-N1-MuRF3 transfiziert und die Expression für 24 h durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und die DNA im Zellkern mit DAPI angefärbt. MuRF3-RFP lokalisiert in H9c2 Zellen wie bereits in diesem Abschnitt beschrieben an Mikrotubuli. MuRF2 kolokalisiert mit MuRF3 an Mikrotubuli.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die MuRF-Heterooligomerisierung einen Einfluss auf die Lokalisation der einzelnen MuRFs haben kann, sollte als nächstes untersucht werden ob die Oligomerbildung die Stabilität der Proteine beeinflussen könnte. Die MuRFs (insbesondere MuRF1) unterliegen einer starken Autoubiquitinierung (Abbildung 8), woraufhin die These aufgestellt wurde, dass Heterodimerisierungen bzw. Heterooligomerisierungen der MuRFs zu einer Verminderung des Eigenabbaus führen. Um dies zu testen, wurden die MuRFs einzeln und zusammen in COS-7 und C2C12 Muskelzellen überexprimiert und untersucht ob die Oligomerisierung einen Einfluss auf die Proteinmenge hat. Die Ko-Expression der MuRFs in COS-7 Zellen führte zu keiner wesentlichen Veränderung der MuRF-Proteinmenge im Vergleich zu den Einzel-Expressionen (Abbildung 25). In C2C12 Muskelzellen konnte hingegen gezeigt werden,

dass MuRF1 und 3 Ko-Expression zu einer Stabilisierung von MuRF1 oder 3 führen (Abbildung 26). Die detektierten Proteinmengen von MuRF1 und 3 waren stärker als die der einzeln hergestellten MuRFs. Ähnliche Beobachtungen konnten auch mit MuRF1 und 2 sowie mit MuRF2 und 3 Ko-Expressionen gemacht werden.

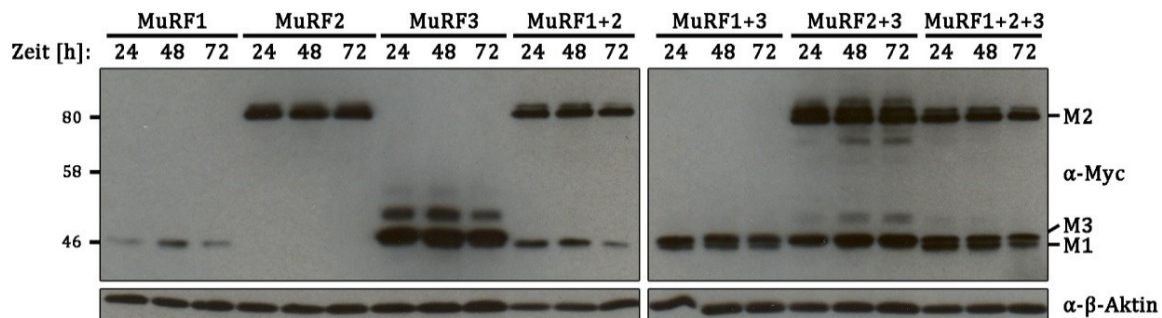


Abbildung 25: Ko-Expressionsstudien mit MuRFs in COS-7 nicht-Muskelzellen. Die MuRF-Proteine (Myc/6xHis markiert) wurden einzeln sowie zusammen für 24, 48 sowie 72 h in COS-7 Zellen synthetisiert. Totallysate der Zellen wurden anschließend im Immunblot analysiert. Alle MuRFs zeigen über den getesteten Zeitraum konstante Proteinmengen. Alleine synthetisiertes MuRF1 zeigt verglichen mit MuRF2 und 3 schwächere Expressionen. Die Ko-Expression der MuRFs führt zu keiner drastischen Veränderung der detektierten Proteinmengen. Abk. M1: MuRF1, M2: MuRF2, M3: MuRF3.

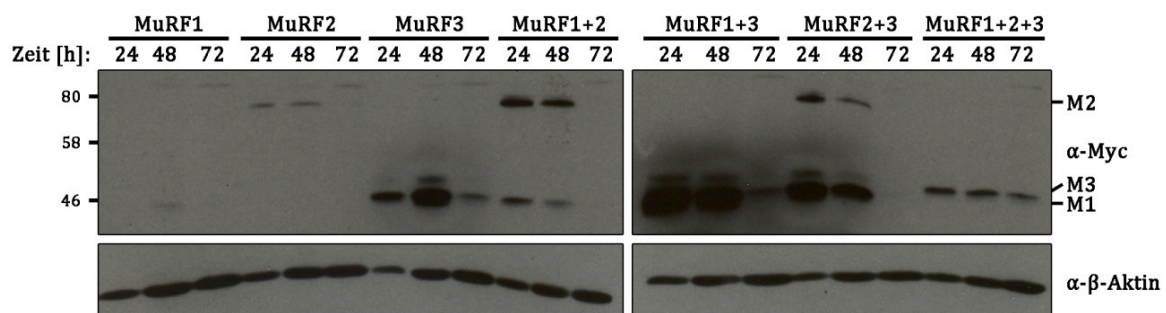


Abbildung 26: Ko-Expressionsstudien mit MuRFs in C2C12 Muskelzellen. Die MuRF-Proteine (Myc/6xHis markiert) wurden einzeln sowie zusammen für 24, 48 sowie 72 h in C2C12 Zellen synthetisiert. Totallysate der Zellen wurden anschließend im Immunblot analysiert. MuRF1 und 2 alleine synthetisiert weist verglichen mit MuRF3 wesentlich geringere Proteinmengen auf. Es konnte bereits gezeigt werden, dass insbesondere MuRF1 einem verstärkten UPS-abhängigen Abbau in Muskelzellen aufgrund einer hohen Autoubiquitinierungsaktivität unterliegt (Abschnitt 3.1.2). Die einzeln synthetisierten MuRFs weisen nach 48 h die maximale Proteinmenge auf welche nach 72 h auf nahezu keine Expression absinkt. Die Ko-Expression von MuRF1 und 3 führt zu einer drastischen Verstärkung des Expressionslevels bzw. vermutlich zu einem verminderten Abbau der Proteine. Ähnliche Ergebnisse konnten mit MuRF2 und MuRF3 beobachtet werden. Überraschenderweise wird dieser Effekt wieder aufgehoben wenn alle MuRFs zusammen hergestellt werden. Abk. M1: MuRF1, M2: MuRF2, M3: MuRF3.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Heterooligomerisierung der MuRF-Proteine deren Stabilität und Lokalisation verändert und damit höchstwahrscheinlich auch ihre Funktionalität beeinflusst.

3.2.3 Charakterisierung der MuRF1-MYLK2 Interaktion

Wie in Abschnitt 3.2.1 dargestellt, konnte in CHX-Abbau-Experimenten gezeigt werden, dass die muskelspezifische Serin/Threonin-Kinase MYLK2 die Stabilität von MuRF1 jedoch nicht von MuRF2 oder 3 herabsetzt. Aufgrund dessen wurde die Hypothese aufgestellt, dass MYLK2 MuRF1 phosphoryliert und damit dessen Stabilität beeinflusst.

Zunächst wurde mit einem Phosphorylierungs-Vorhersage-Programm überprüft ob es potentielle Serin (Ser) und Threonin (Thr) Phosphorylierungsstellen in MuRF1 gibt, die nicht in MuRF2 oder 3 vorhanden sind. Diese Phosphorylierungsstellen könnten für die Instabilität von MuRF1 unter MYLK2 Einfluss verantwortlich sein. Hierfür wurde das Online-Programm NetPhos2.0 [69] verwendet. Mit NetPhos2.0 wurden elf Serin und fünf Threonin Phosphorylierungsstellen in MuRF1 identifiziert, die mit hoher Wahrscheinlichkeit Phosphorylierungsstellen darstellen (Abbildung 27). Anschließend wurden die Proteinsequenzen von humanem MuRF1, 2 und 3 mit einander verglichen und analysiert ob MuRF1 spezifische Ser/Thr besitzt. Es konnten MuRF1 spezifische Ser/Thr nachgewiesen werden, die in hoch homologen Bereichen im N-Terminus von MuRF1 liegen. Genau diese Ser/Thr waren häufig exakt die Stellen, welche als Ser/Thr Phosphorylierungsstellen von NetPhos2.0 vorhergesagt wurden (indiziert mit Pfeilen in Abbildung 27).

70 Ergebnisse

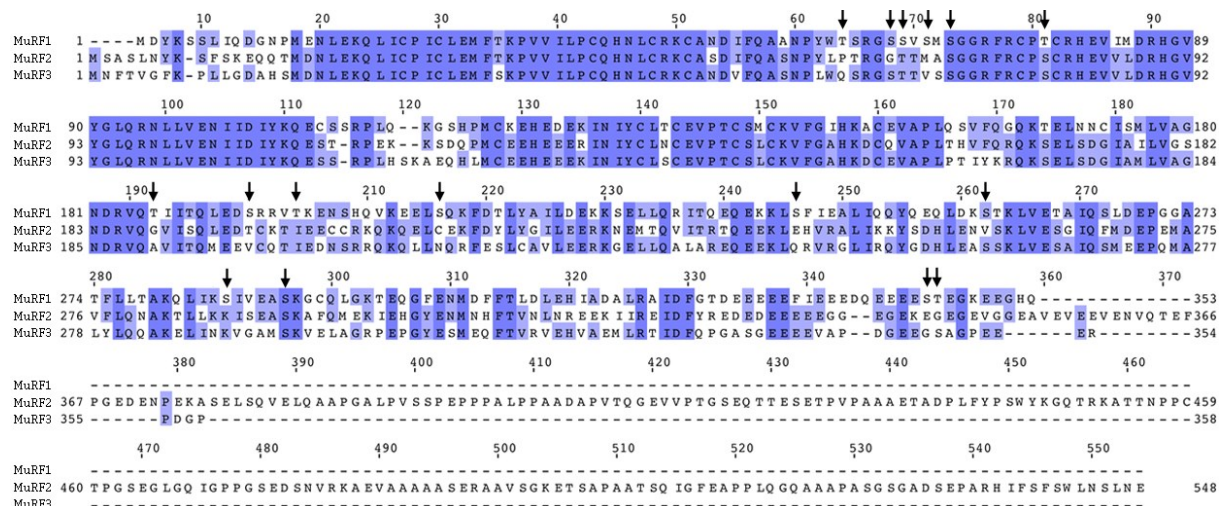


Abbildung 27: MuRF1 weist konservierte potentielle Phosphorylierungsstellen auf. Die humane MuRF1 Proteinsequenz wurde mit dem Online-Programm NetPhos2.0 auf potentielle Ser/Thr Phosphorylierungsstellen analysiert. In dem Vergleich aller humanen MuRF1 Proteinsequenzen sind konservierte Bereiche blau markiert. Die mit der NetPhos2.0 Analyse entdeckten Phosphorylierungsstellen sind mit schwarzen Pfeilen im Vergleich markiert. Auffälligerweise sind sehr viele der mit NetPhos2.0 entdeckten Phosphorylierungsstellen MuRF1 spezifische Serine und Threonine. MYLK2 hatte wie bereits gezeigt wurde auf MuRF1 jedoch nicht auf MuRF2 oder 3 einen Abbaueffekt. Die hier aufgefundenen MuRF1 spezifischen Phosphorylierungsstellen könnten potentiell die Stellen sein, die MYLK2 spezifisch in MuRF1 phosphoryliert und damit dessen Aktivität und Stabilität reguliert.

Dieser Befund erhöhte den Verdacht, dass MYLK2 in der Lage ist MuRF1 spezifisch zu phosphorylieren. Um diese These weiter zu untersuchen, wurden *mobility shift assays* durchgeführt. Diese basieren darauf, dass Proteine, die phosphoryliert wurden, ein leicht verändertes Laufverhalten gegenüber nicht modifizierten Proteinen im SDS-Polyacrylamid-Gel aufweisen. Somit sollte durch Phosphorylierung ein Größenunterschied im SDS-Gel zu sehen sein. Hierfür wurden die MuRFs alleine oder zusammen mit MYLK2 in COS-7 und C2C12-Zellen hergestellt und die Dephosphorylierung durch Phosphatasen mit PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten (Roche, Basel, Schweiz) unterbunden. In diesen Experimenten konnte jedoch kein eindeutiger *mobility shift* beobachtet werden (Abbildung 28).

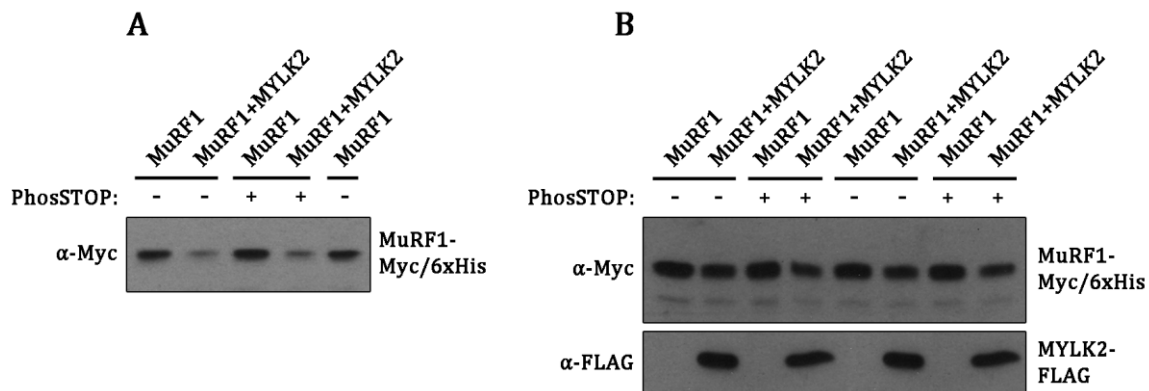


Abbildung 28: Mobility shift assays mit MuRF1 und MYLK2. Die verwendeten Zellen wurden mit Myc/6xHis markiertem MuRF1 und FLAG markiertem MYLK2 transfiziert und alleine oder zusammen für 24 h synthetisiert. Nach dem Zellaufschluss, mit oder ohne Phosphatase-Inhibitoren (PhosSTOP), wurde das Totallysate im Immunblot analysiert. MuRF1 wurde mit α-Myc (-Maus) und MYLK2 mit α-FLAG (-Maus) detektiert. (A) In COS-7-Zellen ist kein *mobility shift* zu sehen. (B) In C2C12-Zellen ist ein leichter Größenunterschied in den mit PhosSTOP behandelten Proben von MuRF1 im Vergleich zu MuRF1 mit ko-exprimiertem MYLK2 zu sehen (vergleiche Bande 3 zu 4 sowie 7 zu 8).

In C2C12-Zellen ist ein sehr leichter Größenunterschied von MuRF1 ko-exprimiert mit MYLK2 im Vergleich zu MuRF1 ohne MYLK2 in den mit PhosSTOP behandelten Zellen zu sehen (Abbildung 28 B ganz rechts). Dieser Größenunterschied kann aber auch auf ein leicht schräges Laufverhalten des SDS-Gels zurückzuführen sein. Insgesamt betrachtet konnte in den *mobility shift* assays kein eindeutig verändertes Laufverhalten und somit kein weiterer Hinweis auf die Phosphorylierungsthese gefunden werden. Damit kann abschließend nicht beurteilt werden ob MYLK2 in der Lage ist MuRF1 zu phosphorylieren. Diese Fragestellung könnte in Zukunft mit spezifischen *in vivo* oder *in vitro* Phosphorylierungsassays eruiert werden.

3.3 Charakterisierung der MuRF1-WDR42A Interaktion

Die WDR42A MuRF1 (und 3) Interaktionen wurden im Weiteren näher untersucht, da WDR42A als eines von wenigen Proteinen mit beiden Screening Methoden (Y2H und SILAC-AP-MS) und jeweils verlässlichen Anreicherungen/Scores als MuRF-Interaktionspartner identifiziert wurde. Des Weiteren konnte die Bindung zwischen WDR42A und MuRF1 sowie MuRF3 bereits mittels Ko-IP bestätigt werden (Abschnitt 3.1.4). Zusätzlich ist WDR42A funktionell hoch interessant, da es potenziell Teil eines MuRF-Multiproteinkomplexes sein könnte. WDR42A ähnliche WD40-Domäne Proteine wurden einerseits als Substrat-Adapter-Proteine in E3-Ubiquitin-Ligase Komplexen und andererseits als Scaffolding-Proteine für die Assemblierung von Multiproteinkomplexen

beschrieben [70]. WDR42A selber wurde jedoch bisher nicht tiefgreifend charakterisiert.

3.3.1 WDR42A wird ubiquitär synthetisiert

Als erstes wurde untersucht, ob die MuRFs und WDR42A in den gleichen Geweben hergestellt werden. Dabei war von besonderem Interesse herauszufinden, ob WDR42A ebenfalls in der quergestreiften Muskulatur (Skelettmuskel und Herzmuskel) synthetisiert wird. Mit einem polyklonalen α -WDR42A Antikörper (A301-556A, Bethyl laboratories, Inc. Montgomery, USA) wurden verschiedene Gewebeproben aus zwölf Wochen alten Wildtyp- (WT) Mäusen (*Mus musculus*) auf WDR42A Proteingehalt untersucht (Abbildung 29). Für die Analyse der gewebespezifischen Synthese von WDR42A wurden jeweils eine männliche und eine weibliche WT-Maus verwendet, um geschlechterspezifische Expressionsmuster auszuschließen bzw. zu erkennen. WDR42A war in den meisten getesteten Geweben nachweisbar (Abbildung 29 A und B). Die Spezifität des benutzten Antikörpers wurde mittels eines siRNA-Experimentes nachgewiesen (Abbildung 31).

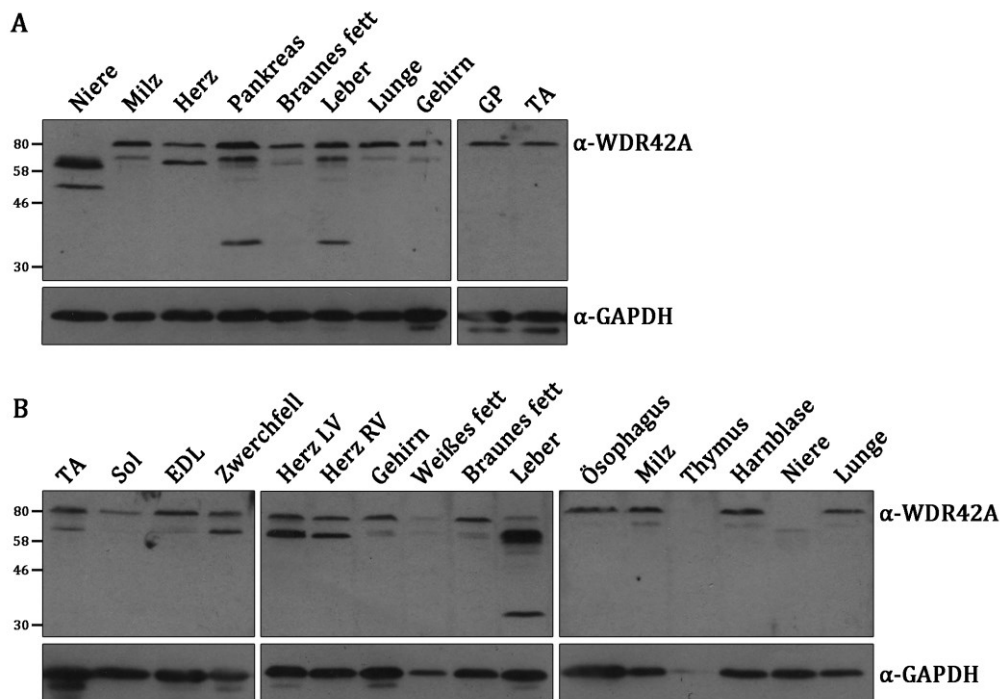


Abbildung 29: Synthese von WDR42A in verschiedenen Geweben der Maus. Die Gewebeproben wurden zwölf Wochen alten WT-Mäusen entnommen, lysiert und anschließend im Immunblot analysiert. Detektion von WDR42A mit α -WDR42A (A301-556A, Kaninchen). Detektion der GAPDH-Ladekontrollen mit α -GAPDH-Maus. (A) Männliche Maus. (B) Weibliche Maus. In (A) und (B) wurde WDR42A in fast allen getesteten Gewebeproben detektiert. Es konnten vier unterschiedlich große WDR42A Proteinvarianten detektiert werden (ca. 80, 70 50 und 35 kDa groß). Abk. GP: Gastrocnemius plantaris, TA: Tibialis anterior, LV: Linker Ventrikel, RV: Rechter Ventrikel, Sol: Musculus Soleus, EDL: Musculus extensor digitorum longus.

In der Online-Datenbank www.UniProt.org [71] sind für Mm-WDR42A (UniProt ID: Q8N7N5) zwei Isoformen (66 und 46 kDa) hinterlegt. Insgesamt konnten vier unterschiedlich große (ca. 80, 70 50 und 35 kDa) WDR42A Proteinvarianten im Immunblot detektiert werden (Abbildung 29). Die 80 und 70 kDa Proteine wurden in fast allen Geweben detektiert. Dem hingegen wurde die 50 kDa große Variante ausschließlich in der Niere und die 35 kDa große in Leber und Pankreas detektiert. Zusätzlich wurden drei minimal unterschiedlich große 70 kDa WDR42A-Proteine detektiert (Abbildung 29 A). WDR42A wird also ubiquitär und damit auch in Skelett- und Herzmuskulatur hergestellt. Demzufolge könnten WDR42A und MuRF1 und 3 unter physiologischen Bedingungen potentiell in der quergestreiften Muskulatur miteinander interagieren.

3.3.2 WDR42A wird während der Muskeldifferenzierung in C2C12-Zellen zunehmend synthetisiert

Anschließend sollte überprüft werden, ob WDR42A auch in Herz- und Skelettmuskel-Zelllinien hergestellt wird. Die Synthese von WDR42A in H9c2 Rattenkardiomyoblasten

(*Rattus norvegicus*) wurde durch die Detektion von WDR42A in den SILAC-AP-MS Experimenten bereits dargestellt (Abschnitt 3.1.2). Im Folgenden wurde untersucht ob WDR42A in C2C12 Skelettmuskelzellen synthetisiert wird. C2C12-Zellen sind Skelettmuskelvorläufer-Zellen, sogenannte Myoblasten, isoliert aus der Maus (*Mus musculus*), die ebenfalls endogenes MuRF aufweisen. Diese C2C12-Zellen können durch Reduktion der Serumkonzentration von 10% auf 2% im Kulturmedium zur Differenzierung gebracht werden. Dies führt zur Verschmelzung der Myoblasten zu mehrkernigen Synzytien, oder auch Myotuben genannt, die einen sehr starken Skelettmuskel-Charakter aufweisen. Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, konnten die beiden großen WDR42A Proteinvarianten (70 und 80 kDa) in C2C12 Myoblasten als auch Myotuben detektiert werden. Zusätzlich wurde eine drastische Erhöhung der WDR42A Proteinmenge nach 7 und 14 Tagen Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben beobachtet.

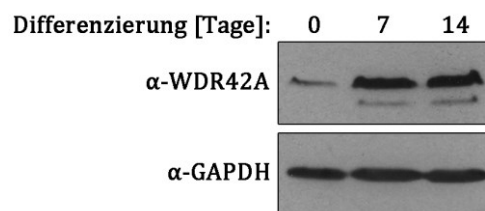


Abbildung 30: WDR42A wird in C2C12 Myoblasten und Myotuben synthetisiert. Äquivalente Mengen von C2C12-Zellen wurden nach 0, 7 und 14 Tagen Differenzierung lysiert und anschließend im Immunblot analysiert. Detektion im Immunblot mit α-WDR42A (Kaninchen) und α-GAPDH (Maus) als Ladekontrolle. WDR42A konnte in Myoblasten und auch in 7 bzw. 14 Tage differenzierten Myotuben detektiert werden. Die WDR42A Proteinmenge ist in Myotuben (7 und 14 Tage) um ein vielfaches gesteigert verglichen mit Myoblasten (0 Tage). In Myoblasten kann 80 kDa großes WDR42A detektiert werden. Längere Expositionszeiten des Immunblotes konnten jedoch zeigen, dass auch die kleinere 70 kDa Proteinvariante in undifferenzierten Zellen hergestellt wird (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich konnte in Myotuben ebenfalls 70 und 80 kDa großes WDR42A detektiert werden. Die Proteinmenge der größeren Proteinvariante ist jeweils größer als die der kleineren.

Um die Spezifität des benutzten Antikörpers zu überprüfen, wurde anschließend ein WDR42A siRNA-Experiment in C2C12-Zellen durchgeführt. Die Synthese beider WDR42A Proteinvarianten konnten erfolgreich (ca. 90% Effizienz) herunterreguliert werden (Abbildung 31). Dies zeigt zum einen die Spezifität des benutzten Antikörpers und zum anderen, dass beide detektierten Proteine tatsächlich WDR42A darstellen. Die bisher nicht bekannte 80 kDa Proteinvariante stellt also ebenfalls spezifisch detektiertes WDR42A dar.

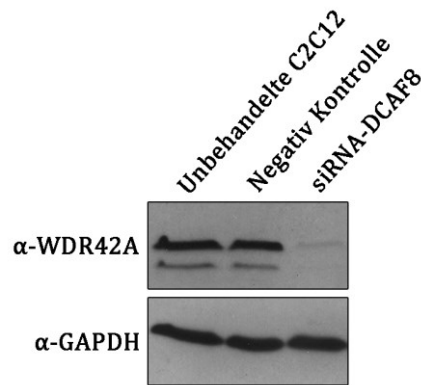


Abbildung 31: Effiziente siRNA-Herunterregulation der beiden WDR42A Proteinvarianten. In nicht differenzierten C2C12 Myoblasten wurde WDR42A (DCAF8) mit spezifischer DCAF8-siRNA mit einer Effizienz von ca. 90% herunterreguliert. Die DCAF8-siRNA (25 mM) und die siRNA Negativkontrolle (25 mM) wurden mit DharmaFECT 3 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) in C2C12-Zellen transfiziert. Als Negativkontrolle wurde ein Gemisch aus vier verschiedenen unspezifisch bindenden siRNAs (ON-TARGET plus Non-targeting Pool, ebenfalls Thermo Fisher Scientific) verwendet.

Wie in Abbildung 30 gezeigt werden konnte, wird WDR42A nach Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben in C2C12-Zellen vermehrt hergestellt. Um diese Erhöhung der Proteinsynthese noch weiter zu charakterisieren, wurde eine Differenzierungsreihe durchgeführt und die Veränderung der Proteinmenge über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die WDR42A Proteinmenge in der frühen Phase der Differenzierung sehr schnell ansteigt. Nach ca. 4-5 Tagen ist ein Plateau erreicht und die Synthese hat einen Maximalwert erlangt (Abbildung 32).

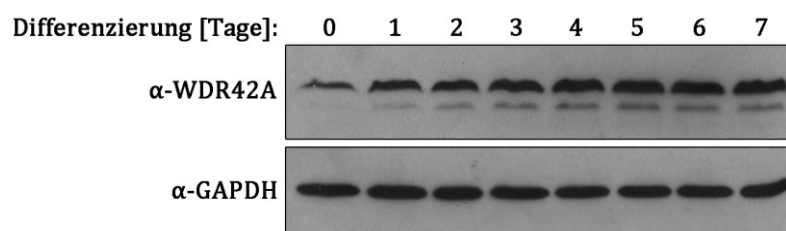


Abbildung 32: Die WDR42A Proteinmenge steigt in der frühen C2C12 Differenzierung stark an. Die Differenzierung von C2C12-Zellen wurde täglich über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden äquivalente Zellmengen lysiert und anschließend im Immunblot detektiert. Detektion im Immunblot mit α-WDR42A (Kaninchen) und α-GAPDH (Maus) als Ladekontrolle. Die WDR42A Proteinmenge steigt in der frühen Differenzierungsphase (1-3 Tage) stark an. Nach ca. 4-5 Tagen ist eine Maximalmenge erreicht, die nicht weiter überschritten wird.

Diese Ergebnisse zeigen, dass WDR42A (wie die MuRFs) in C2C12 Myoblasten und Myotuben hergestellt wird. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die WDR42A Proteinmenge in der Differenzierung stark ansteigt.

3.3.3 MuRF1 und 3 kolokalisieren mit WDR42A

Nachdem gezeigt werden konnte, dass WDR42A äquivalent zu den MuRF-Proteinen ebenfalls in der quergestreiften Muskulatur und in zwei Muskelzelllinien (H9c2 und C2C12) hergestellt wird, sollte zusätzlich getestet werden, ob die Interaktionspartner in denselben Zellkompartimenten lokalisieren. Dazu wurden MuRF1 und 3 sowie WDR42A als GFP und RFP Fusionsproteine in immortalisierten Zelllinien (COS-7, C2C12 und H9c2) jeweils alleine und zusammen synthetisiert und dessen subzelluläre Verteilung untersucht. Des Weiteren wurde zusätzlich auch die endogene, also Tag-freie Lokalisation bzw. Kolokalisation der beiden Interaktionspartner unter basalen Bedingungen untersucht. Die Beschreibung der Lokalisation von GFP und RFP markiertem MuRF1, 2 und 3 in immortalisierten Zelllinien findet sich in Abschnitt 3.2.2. Zunächst wurde die Verteilung von GFP markiertem WDR42A charakterisiert. Um zu untersuchen, ob die Position des verwendeten Tags einen Einfluss auf die Lokalisation des Proteins hat, wurde sowohl N- als auch C-terminal markiertes WDR42A untersucht. Wie in Abbildung 33 zu sehen ist, lokalisiert GFP-WDR42A unabhängig von der Position des Fluorophors hauptsächlich im Zytosol. Gleichartig lokalisiert RFP markiertes WDR42A ebenfalls im Zytosol, war jedoch auch im Zellkern nachweisbar. Somit kann also mit den beiden hoch homologen GFP und RFP Fusionsproteinen ein unterschiedliches Lokalisationsmuster beobachtet werden. Andererseits hat die Position des GFP- und RFP-Tags keinen entscheidenden Einfluss auf die Lokalisation der Proteine. Feine Unterschiede wurden jedoch mit GFP markiertem WDR42A zwischen N- und C-terminaler Position des Tags beobachtet. N-terminal GFP fusioniertes WDR42A zeigte eine punktierte Strukturierung des Proteins, wohingegen C-terminal markiertes eine eher unstrukturierte ubiquitäre zytoplasmische Verteilung in der Zelle aufwies.

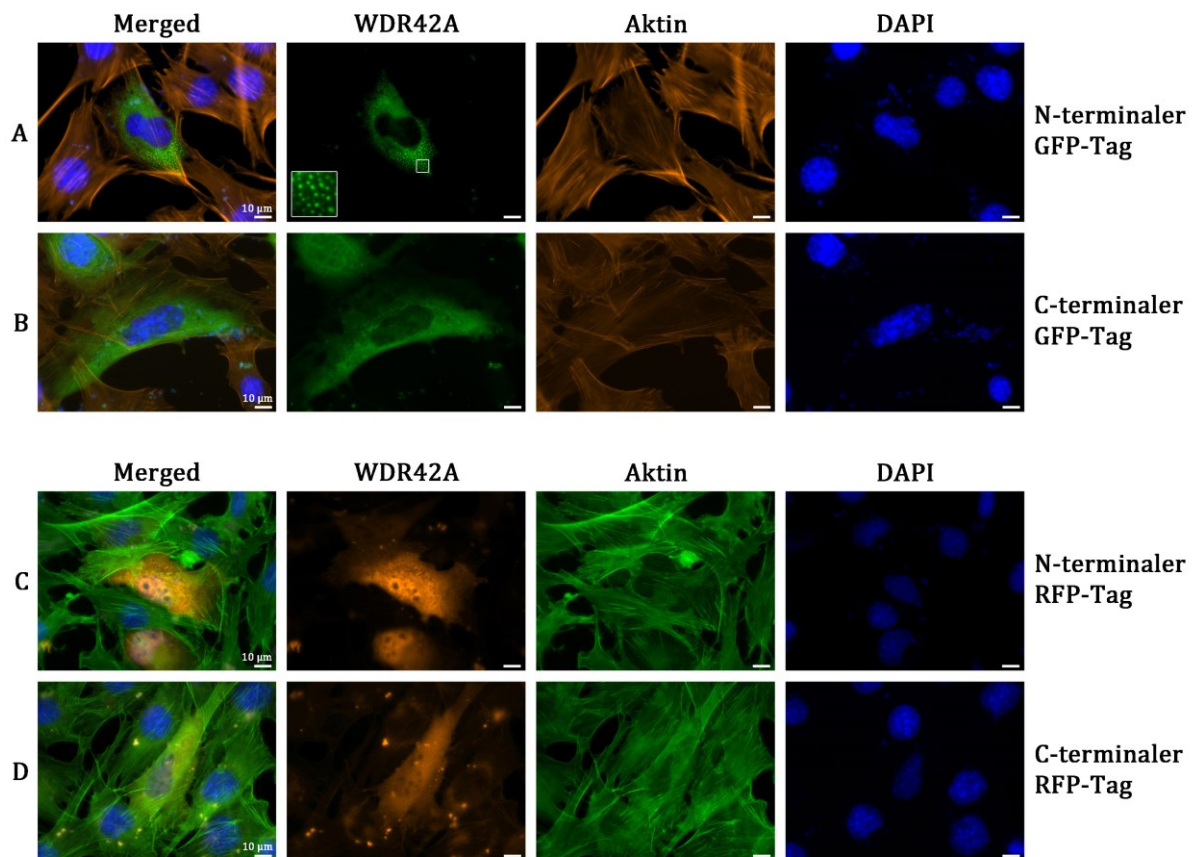


Abbildung 33: Lokalisation von GFP und RFP markiertem WDR42A in C2C12 Zellen. C2C12 Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert und anschließend mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert. Nach 24 h Expression wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert, das Aktinzytoskelett mit FITC- oder TRITC-Phalloidin und der Zellkern mit DAPI gefärbt. Die Dokumentation erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer Z1, Zeiss). GFP markiertes WDR42A (A und B) lokalisiert ausschließlich im Zytosol und RFP markiertes (C und D) im Zytosol und im Zellkern. N-terminal GFP markiertes WDR42A (A) weist im Zytosol eine in kleinen Punkten lokalisierte Strukturierung auf welche mit C-terminal GFP markiertem WDR42A (B) nicht zu beobachten ist. Dieses zeigt eine zytosolische ubiquitäre Verteilung.

Anschließend sollte überprüft werden, ob MuRF1 und 3 mit WDR42A kolokalisieren. Wie in den Abbildungen 34, 35, 36 und 37 zu sehen ist, kolokalisieren GFP sowie RFP markiertes WDR42A und MuRF1 als auch MuRF3 in C2C12 und COS-7 Zellen miteinander. MuRF1 und WDR42A kolokalisieren im Zyotosol meist in punktförmigen Strukturen. MuRF3 und WDR42A hingegen kolokalisieren im Zytosol meist ubiquitär oder wie in Abbildung 35 (C2C12) und Abbildung 37 (COS-7) zu sehen ist auch in filamentösen Geflechten. Bei diesen Strukturen handelt es sich höchstwahrscheinlich um Mikrotubuli, da MuRF3 u.a. an Mikrotubuli lokalisiert ist [32, 36, 38]. Eine Kolokalisation von MuRF2 mit WDR42A konnte nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Diese Resultate reflektieren die Ergebnisse der Ko-IP Experimente in denen eine spezifische Interaktion von MuRF1 und 3 mit WDR42A gezeigt werden konnte (Abbildung 12).

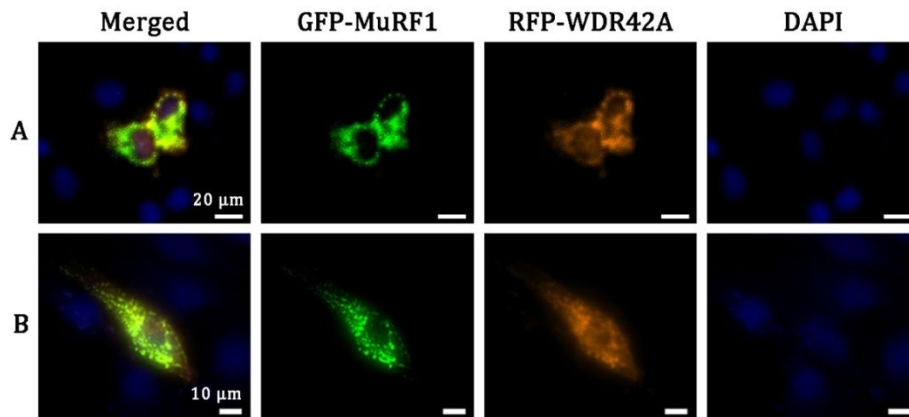


Abbildung 34: Kolokalisation von MuRF1 und WDR42A in C2C12 Zellen. C2C12 Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert und anschließend mit den entsprechenden Konstrukten (pZsGreen-C1-MuRF1 und pmCherry-C1-WDR42A) transfiziert. Nach 24 h Expression wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und der Zellkern mit DAPI angefärbt. Die Dokumentation erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop. MuRF1 und WDR42A kolokalisieren im Zytosol von C2C12 Zellen miteinander. MuRF1 weist die in Abschnitt 3.2.2 dargestellte punktierte Strukturierung im Zytosol auf. WDR42A lokalisiert ebenfalls an diesen Strukturen.

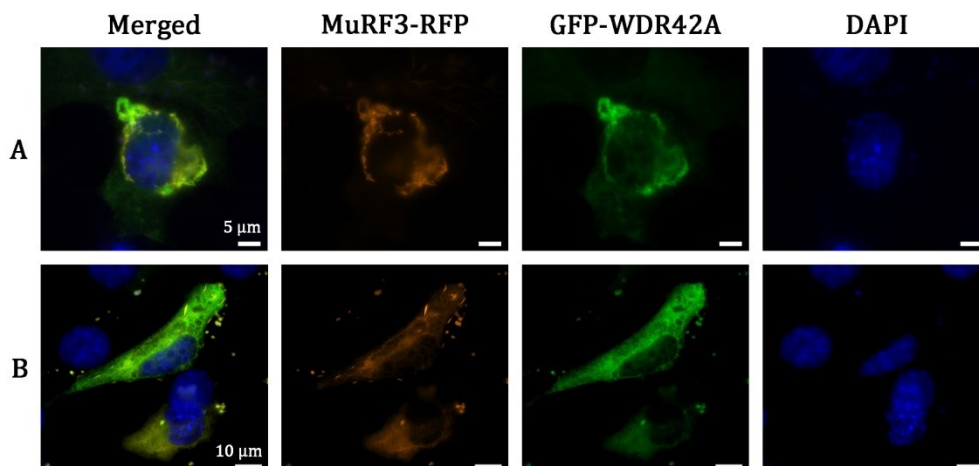


Abbildung 35: Kolokalisation von MuRF3 und WDR42A in C2C12 Zellen. C2C12 Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert und anschließend mit den entsprechenden Konstrukten (pmCherry-N1-MuRF3 und pZsGreen-C1-WDR42A) transfiziert. Nach 24 h Expression wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und der Zellkern mit DAPI angefärbt. Die Dokumentation erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop. MuRF3 und WDR42A kolokalisieren in C2C12 Zellen im Zytosol und an Mikrotubuli ähnlichen Strukturen miteinander. Die Ausprägung der Kolokalisation in Mikrotubuli wurde in COS-7 Zellen (Abbildung 37) eindeutiger beobachtet.

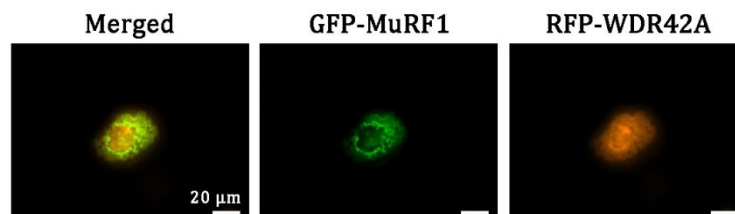


Abbildung 36: Kolokalisation von MuRF1 und WDR42A in COS-7 Zellen. COS-7 Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert und anschließend mit den entsprechenden Konstrukten (pZsGreen-C1-MuRF1 und pmCherry-C1-WDR42A) transfiziert. Nach 24 h Expression wurden die Zellen unfixiert (Live cell imaging) mit einem inversen Fluoreszenzmikroskop dokumentiert. MuRF1 und WDR42A kolokalisieren im Zytosol miteinander. MuRF1 zeigt die in Abschnitt 3.2.2 dargestellte punktierte Lokalisation. WDR42A kolokalisiert ebenfalls in diesen Strukturen mit MuRF1.

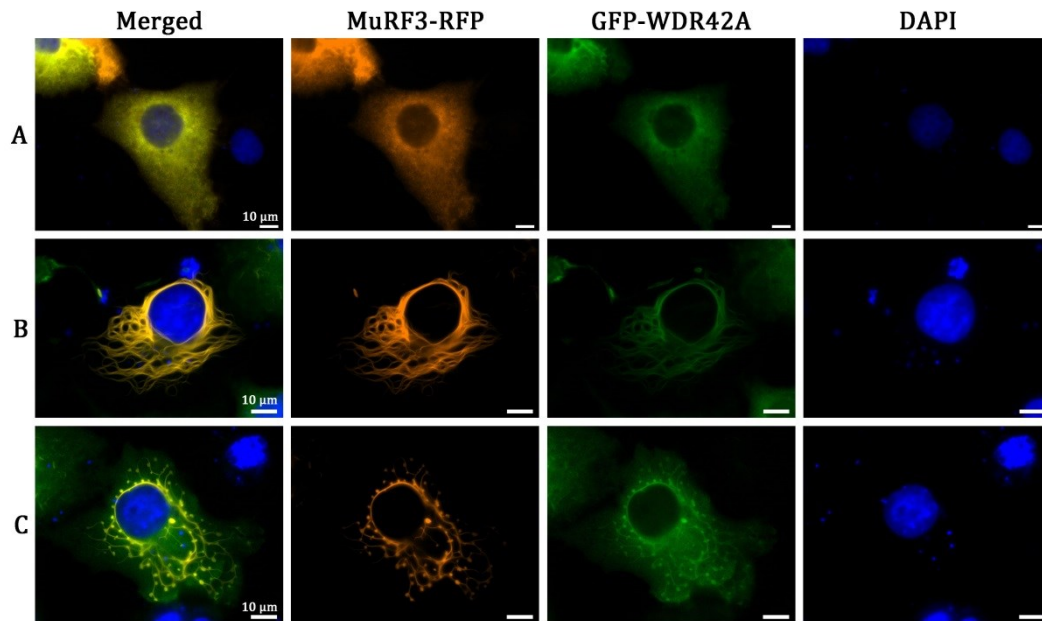


Abbildung 37: Kolokalisation von MuRF3 und WDR42A in COS-7 Zellen. COS-7 Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert und anschließend mit den entsprechenden Konstrukten (pmCherry-N1-MuRF3 und pZsGreen-C1-WDR42A) transfiziert. Nach 24 h Expression wurden die Zellen mit 4% PFA fixiert und der Zellkern mit DAPI angefärbt. Die Dokumentation erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop. MuRF3 kolokalisiert mit WDR42A in COS-7 Zellen im Zytosol (A) und an Mikrotubuli (B und C). Die Mikrotubuli-Lokalisation von MuRF3 entspricht damit der in Abschnitt 3.2.2 beschriebenen Lokalisation in H9c2 Zellen. WDR42A kolokalisiert mit MuRF3 in COS-7 Zellen an diesen Strukturen, wenn diese zusammen überexprimiert werden.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass MuRF1 und 3 mit WDR42A in COS-7 und C2C12 Muskelzellen kolokalisieren, sollte überprüft werden, ob endogenes MuRF1 (spezifischer MuRF3 Antikörper nicht verfügbar) ebenfalls mit WDR42A kolokalisiert.

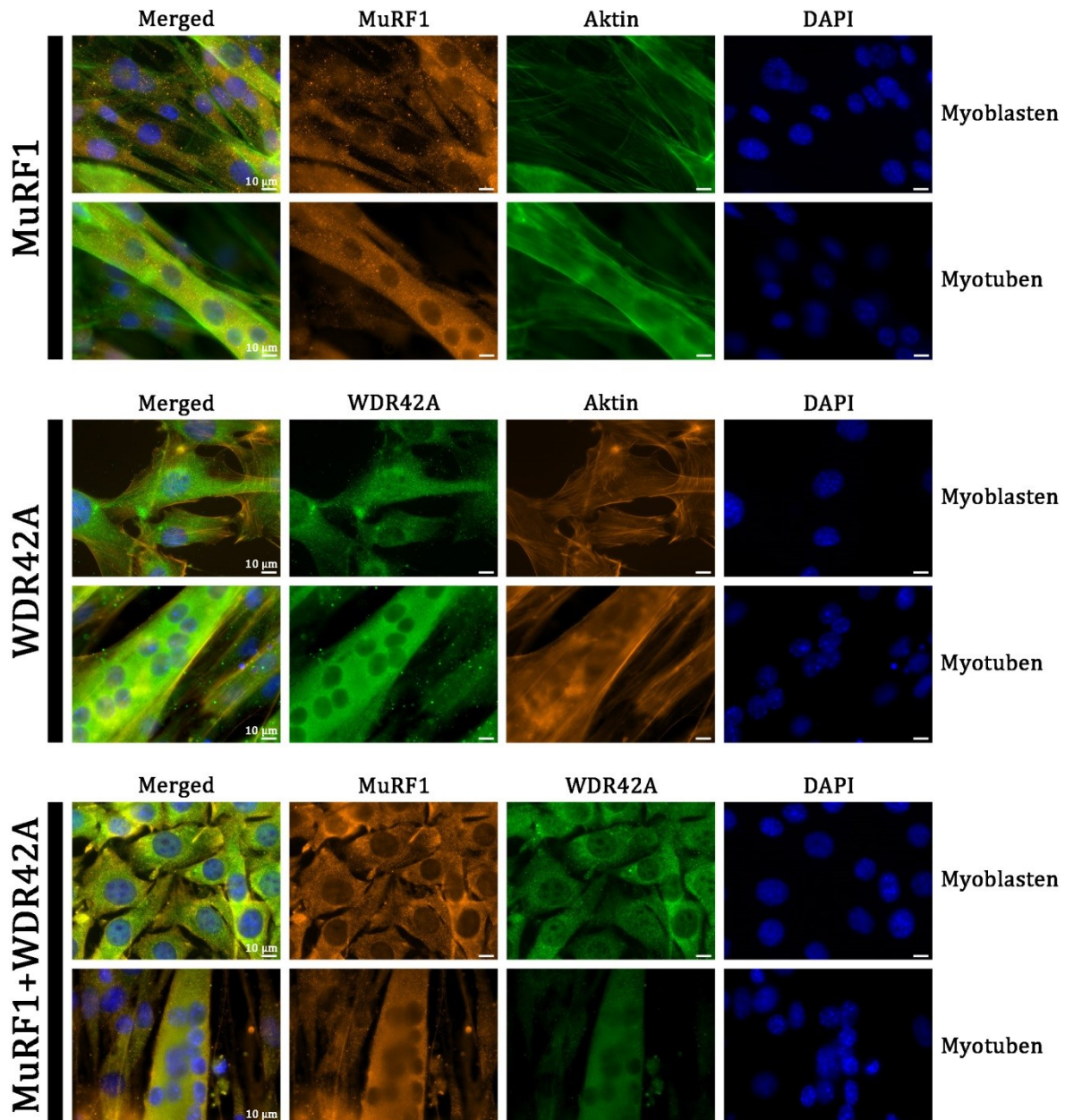


Abbildung 38: Kolokalisation von endogenem MuRF1 und WDR42A in C2C12 Zellen. C2C12 Myoblasten wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 80-90% kultiviert und durch die Zugabe von Differenzierungsmedium in 5-7 Tagen zu Myotuben differenziert. Myoblasten und Myotuben wurden mit 4% PFA fixiert und MuRF1 und WDR42A mit spezifischen primären Antikörpern gebunden (Tabelle 10). Anschließend wurden MuRF1 und WDR42A in den Zellen mit einem an den primären Antikörper bindenden und mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörper (Alexa-Fluor 488 und 555, Tabelle 11) gefärbt und mittels eines inversen Fluoreszenzmikroskops detektiert. Zusätzlich wurde das Aktinzytoskelett mit Phalloidin-FITC oder -TRITC angefärbt. MuRF1 und WDR42A lokalisieren in Myoblasten und Myotuben in kleinen punktierten Strukturen, welche stark den beschriebenen Lokalisationen der markierten Proteine ähneln. Doppelfärbungen mit beiden Antikörpern zeigten, dass beide Proteine im Zytosol in eben diesen punktierten Strukturen miteinander kolokalisieren. Die Kolokalisation ist in Myotuben stärker ausgeprägt als in Myoblasten.

Wie in Abbildung 38 zu sehen ist konnte auf endogener Ebene ebenfalls eine Kolokalisation der beiden Proteine beobachtet werden. Endogenes MuRF1 und WDR42A lokalisieren jeweils in kleinen punktförmigen Strukturen. In den Überlagerungsbildern ist zu sehen, dass beide Proteine in diesen punktförmigen Strukturen miteinander

kolokalisieren. Dabei ist zu beachten, dass Protein-Fraktionen detektiert werden konnten, die nicht miteinander interagieren und Fraktionen, die miteinander interagieren (grüne, rote und gelbe Lokalisationen). Beide Proteine kolokalisieren in Myotuben wesentlich stärker als in Myoblasten.

3.3.4 Direkte MuRF1 WDR42A Interaktion

Nachdem mit verschiedenen Methoden (Y2H, SILAC-AP-MS, Ko-IP, IHC) gezeigt werden konnte, dass MuRF1 und WDR42A auf zellulärer Ebene interagieren, sollte zusätzlich überprüft werden, ob die Proteine direkt im zellfreien System (*in vitro*) miteinander interagieren können. Diesbezüglich wurden die Interaktionspartner in *E. coli* Bakterien als rekombinante Proteine hergestellt und anschließend über Affinitätssäulen gereinigt. Diese Proteine wurden anschließend in direkten Protein-Protein Interaktionsstudien verwendet.

Zunächst wurde WDR42A als GST markiertes Fusionsprotein in *E. coli* synthetisiert und über Glutathion-Sepharose affinitätschromatographisch gereinigt (Abbildung 39). Nach Bindung des WDR42A-GSTs an das Säulenmaterial, erfolgte die Elution durch Abschneiden des GST-Tags mit der PreScission Protease.

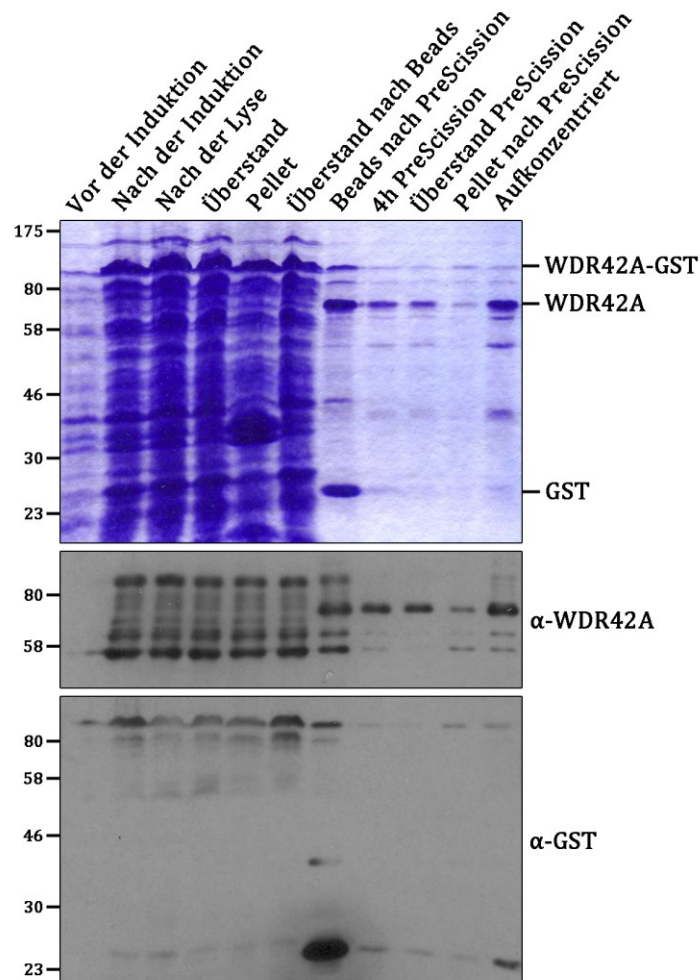


Abbildung 39: Aufreinigung von rekombinantem WDR42A-GST. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese mit anschließender Coomassie Brilliantblau R-250 Färbung des Gels und Immunblotting. Die Herstellung von WDR42A-GST erfolgte in *E. coli* BL21-Rosetta (DE3) Zellen. Die Synthese wurde mit 50 μ M IPTG induziert und bei 16°C ÜN (bis ca. 24 h) durchgeführt. Die Zellyse wurde mit einer French Press (2x) auf Eis in Phosphatpuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 18) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Bindung an Glutathion Sepharose Beads ÜN oder mindestens für 3 h bei 4°C. Wie in der Abbildung zu sehen ist wurde WDR42A nach der IPTG Induktion stark synthetisiert, der Großteil des Proteins war löslich und der GST-Tag konnte mit der PreScission Protease effizient abgeschnitten werden. GST verbleibt nach dem Abschnitten gebunden an dem Säulenmaterial und das Tag-freie weiterhin lösliche WDR42A befindet sich im Elutionsüberstand. Nach dem Abschnitten des Tags und einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 12.000 rpm (17.200g) sowie anschließender Aufkonzentrierung mit 10K Amicon-Säulen wurde WDR42A bei -80°C bis zum Experiment gelagert oder direkt verwendet.

Die affinitätschromatographische Aufreinigung von MuRF1 erfolgte über einen MBP-Tag. Dazu wurde MuRF1 ebenfalls in *E. coli* synthetisiert und über Amylose gereinigt (Abbildung 40).

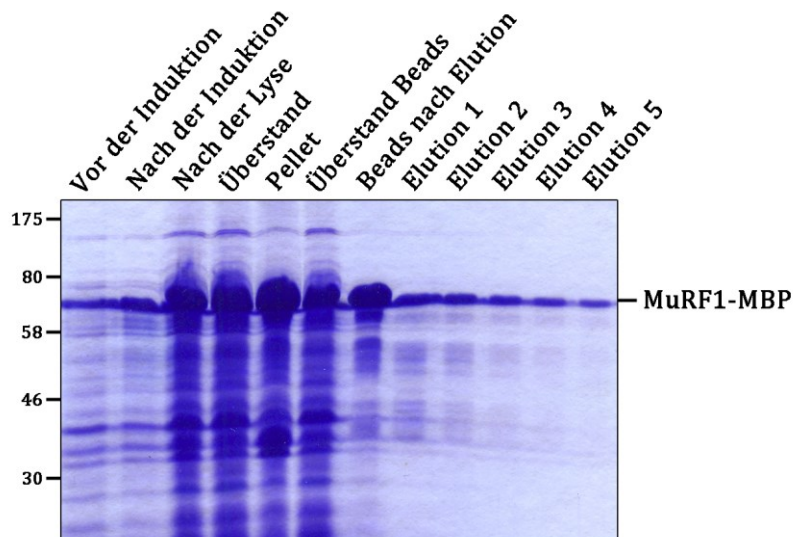


Abbildung 40: Aufreinigung von rekombinantem MuRF1-MBP. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese mit anschließender Coomassie Brilliantblau R-250 Färbung des Gels. Die Herstellung von MuRF1-MBP (pMAL-c4e) erfolgte in *E. coli* BL21-Rosetta (DE3) Zellen. Wie in der Abbildung zu sehen ist wurde MuRF1-MBP auch schon ohne IPTG Induktion moderat synthetisiert. Nichtsdestotrotz wurde die Expression mit 100 μ M IPTG induziert, was wiederum zu einer leicht vermehrten Expression des Proteins führte. Nach der Zellyse mit einer French Press (2x) wurde das Zellysats bei 12.000 rpm (17.200g) abzentrifugiert. Wie in der Abbildung zu sehen ist, ist der Großteil des Proteins (etwa 50%) in der löslichen Fraktion. Diese wurde anschließend an die Amylose-Beads gebunden. Nach viermaligem waschen der Säule mit Phosphatpuffer wurden die gebundenen MuRF1 Proteine mit 10 mM Maltose eluiert, vereinigt und anschließend bei -80°C gelagert oder direkt experimentell verwendet.

Die rekombinanten Proteine wurden anschließend in einem direkten Protein-Protein-Interaktionsassay eingesetzt. Wie in Abbildung 41 zu sehen ist konnte eine recht schwache direkte Interaktion zwischen MuRF1-MBP und WDR42A-GST beobachtet werden. MuRF1-MBP bindet in der Negativkontrolle an die eigentlich ausschließlich GST bindende Glutathion Sepharose. Jedoch ist das MuRF1 Signal im GST Pull-Down des Immunblot leicht stärker als das in der Negativkontrolle. Dies zeigt, wenn auch nicht eindeutig, dass MuRF1 und WDR42A im zellfreien System direkt miteinander interagieren können. Zukünftige Experimente mit Tag-freien MuRF1 oder WDR42A sollen diese These bestätigen.

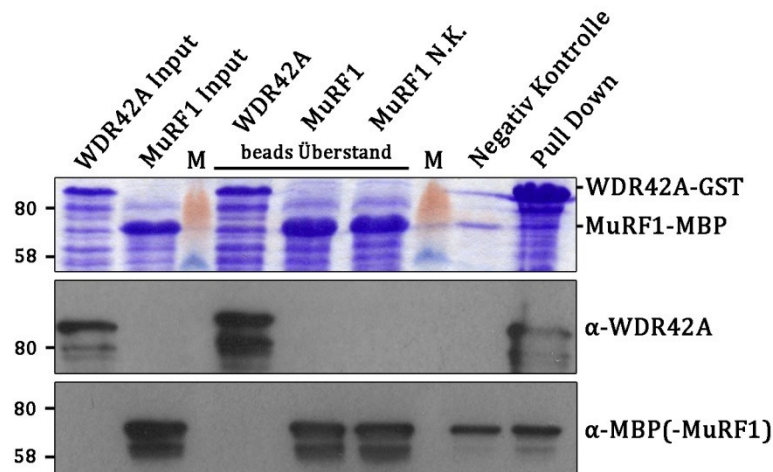


Abbildung 41: Direkte Interaktionsstudien mit MuRF1 und WDR42A. GST Pull-Down mit WDR42A-GST und MuRF1-MBP. WDR42A-GST wurde ÜN an Glutathion Sepharose gebunden. Anschließend wurde ein MuRF1-MBP Lysat auf die WDR42A gebundenen Säule gegeben und für 1 h inkubiert. Als Negativkontrolle wurde überprüft, ob MuRF1-MBP unspezifisch an Glutathion Sepharose bindet. Wie in der Negativkontrolle zu sehen ist bindet MuRF1-MBP teilweise unspezifisch an die Glutathion Sepharose. Im Pull-Down Experiment ist jedoch auch zu sehen, dass mehr MuRF1 an WDR42A gebundene Sepharose bindet.

3.3.5 WDR42A wird wie MuRF1 unter Skelettmuskelatrophie vermehrt hergestellt

MuRF1 spielt eine entscheidende Rolle in der Muskelatrophie und Herzmuskel-Hypertrophie [42, 47]. Unter Muskelatrophie steigt die MuRF1 Proteinmenge stark an. Aufgrund dessen sollte überprüft werden, ob der neue MuRF1 Interaktionspartner WDR42A ebenfalls eine Rolle in diesen Muskelkrankheiten spielt. Um dies zu testen, wurde Skelettmuskelatrophie und Herzmuskelhypertrophie in adulten Mäusen induziert und die WDR42A Proteinmenge quantifiziert.

Herzmuskelhypertrophie wurde durch transverse Aorten-Konstriktion (TAC, *Transverse aortic constriction*) in adulten Mäusen induziert. Als Kontrollen dienten scheinoperierte WT-Mäuse (Sham) [72]. Um zu beweisen, dass erfolgreich Herzmuskelhypertrophie induziert wurde, wurden die Herzgewichte der TAC-Mäuse und der Kontroll-Mäuse ermittelt und miteinander verglichen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass erfolgreich Herzmuskelhypertrophie induziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Wie in Abbildung 42 zu sehen ist, konnte keine differenzielle Synthese von WDR42A in diesen Experimenten beobachtet werden. Die synthetisierte Proteinmenge von WDR42A ändert sich nicht durch die Induktion von Herzmuskelhypertrophie. Dies deutet darauf hin, dass WDR42A keine Rolle in der Herzmuskelhypertrophie spielt.

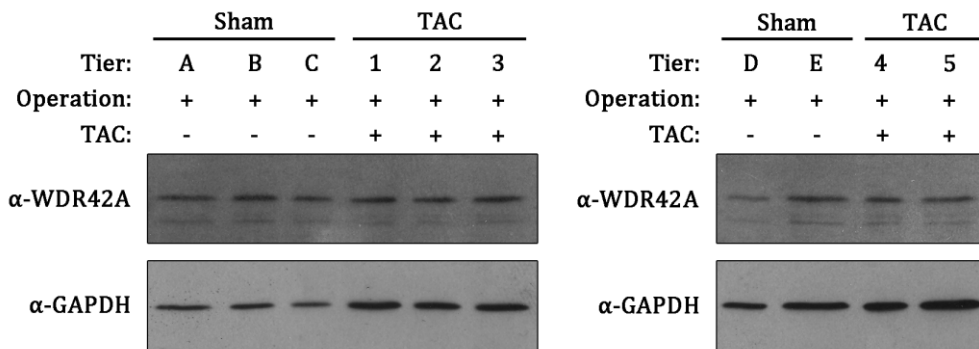


Abbildung 42: WDR42A wird nicht differentiell synthetisiert durch TAC induzierte Herzmuskelhypertrophie in WT-Mäusen. Nach Durchführung der TAC- und Sham-Operationen [72] wurden die Herzen entnommen, lysiert und im Immunblot analysiert. Detektion im Immunblot mit α -WDR42A (Kaninchen) und α -GAPDH (Maus) als Ladekontrolle. Die Synthese von WDR42A ändert sich nicht durch die Induktion von Herzmuskelhypertrophie in TAC-Mäusen im Vergleich zu Sham Tieren.

Des Weiteren wurden zwei Methoden (Hunger und Denervation) verwendet, um Skelettmuskelatrophie in adulten Mäusen zu induzieren. Wie in Abbildung 43 zu sehen ist änderte sich die Synthese von WDR42A nicht merklich durch Hunger-induzierte Skelettmuskelatrophie. Dies könnte darauf hin deuten, dass WDR42A im Gegensatz zu MuRF1 keine Rolle in der durch Hunger induzierten Skelettmuskelatrophie spielt. Jedoch kann dies zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, da auch ohne Veränderung des Expressionsmusters eine Involvierung möglich sein könnte.

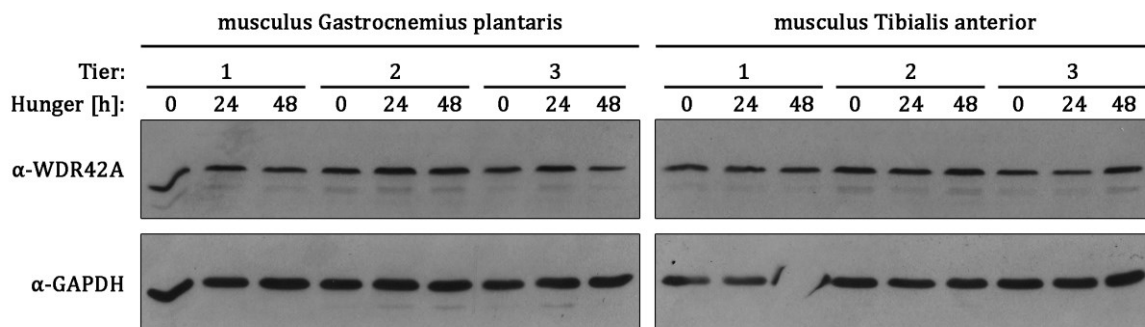


Abbildung 43 Die Synthese von WDR42A ändert sich nicht in Hunger-induzierter Skelettmuskelatrophie. In männlichen Mäusen wurde durch Nahrungsentzug für 24 h und 48 h Skelettmuskelatrophie induziert, GP und TA Muskelgewebe wurde entnommen, dieses lysiert und im Immunblot analysiert. Detektion im Immunblot mit α -WDR42A (Kaninchen) und α -GAPDH (Maus) als Ladekontrolle. Es konnte keine Veränderung der WDR42A Proteinmenge durch Hunger-induzierte Skelettmuskelatrophie beobachtet werden.

Als zweites Atrophie-Modell, um die Regulation der Proteinsynthese von WDR42A in der Atrophie zu untersuchen, wurde in Mäusen mittels Immobilisierung Skelettmuskelatrophie induziert. Um zu beweisen, dass Skelettmuskelatrophie in den Mäuse induziert wurde, wurde das Körpergewicht und das Gewicht der entnommenen Muskeln ermittelt und im Verhältnis zueinander betrachtet. Hierbei konnte gezeigt

werden, dass Skelettmuskelatrophie induziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Wie in Abbildung 44 zu sehen ist konnte durch Denervations-induzierte Skelettmuskelatrophie ein signifikanter Anstieg des WDR42A Proteingehaltes im Gastrocnemius plantaris (GP) und Tibialis anterior (TA) Muskel beobachtet werden. Im Vergleich mit den innervierten Muskeln ist die WDR42A Proteinmenge im denervierten Muskel verdreifacht. Diese Induktion von WDR42A ist äquivalent zu der MuRF1 Hochregulation unter atrophischen Bedingungen.

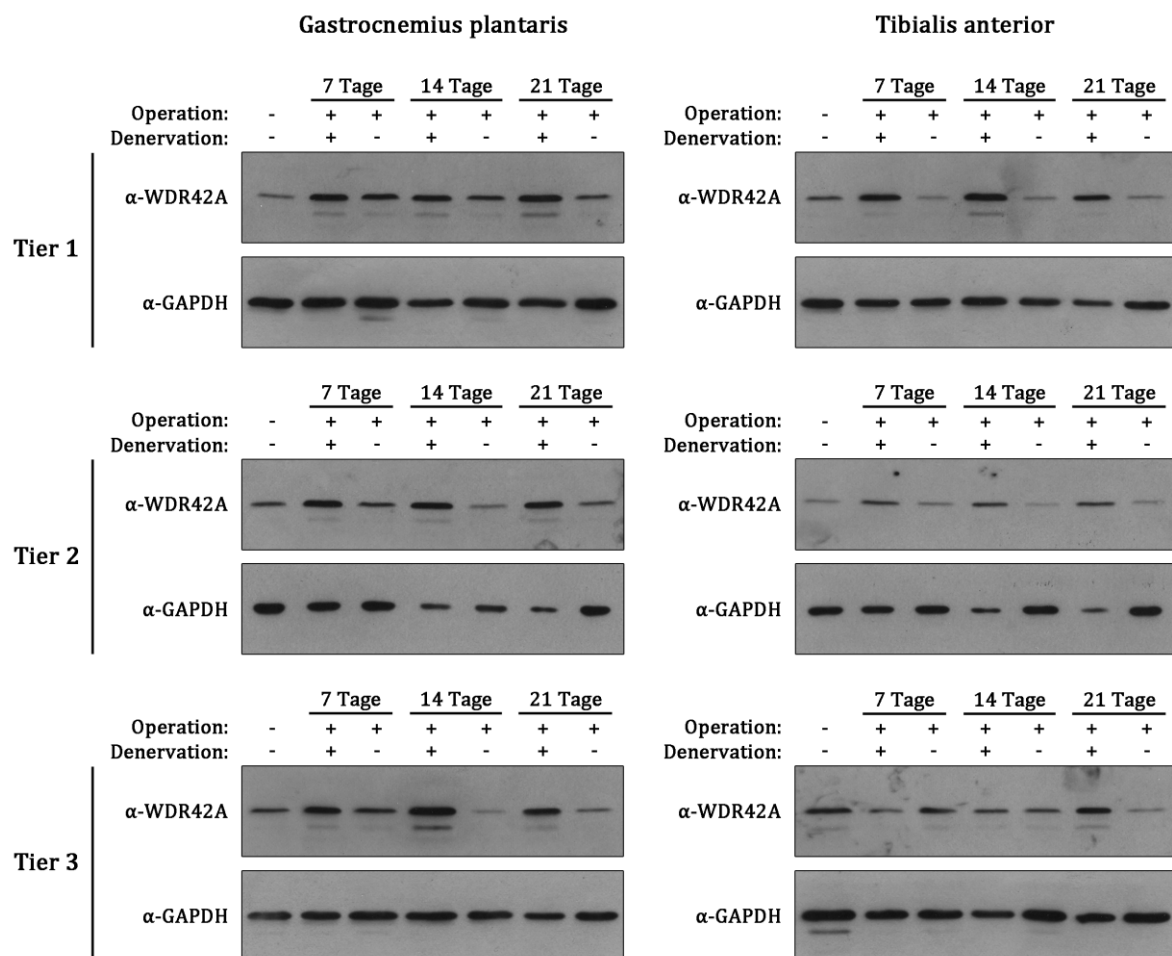


Abbildung 44: Die Synthese von WDR42A wird durch Denervations-induzierte Skelettmuskelatrophie gesteigert. Adulten C57BL/6N Mäusen wurde der linke Ischiasnerv ligiert und damit die Mäuse immobilisiert. Das kontra-laterale Bein wurde als Sham-Kontrolle verwendet und nicht operierte Mäuse als zweite Kontrolle. GP und TA Muskeln wurden entnommen, lysiert und im Immunblot analysiert. Detektion im Immunblot mit α-WDR42A (Kaninchen) und α-GAPDH (Maus) als Ladekontrolle. Die Proteinmenge von WDR42A steigt nach Atrophie-Induktion stark an. Dieser Anstieg kann nach 7, 14 und 21 Tagen Atrophie-Induktion beobachtet werden. Des Weiteren kann dieser Anstieg in drei unabhängigen Experimenten in zwei unterschiedlichen Muskeln (GP und TA) beobachtet werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass WDR42A, wie dessen Interaktionspartner MuRF1, in der Pathogenese von Skelettmuskelatrophie eine entscheidende Rolle zukommen könnte.

3.3.6 Herunterregulation von WDR42A in C2C12 Myotuben führt zu Atrophie-Resistenz

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass die spezifische Deletion von MuRF1 zu einer Skelettmuskelatrophie-Resistenz führt [47]. Da WDR42A wie MuRF1 unter Atrophie hochreguliert ist und spezifisch mit MuRF1 interagiert, sollte überprüft werden, ob siRNA-vermittelte Herunterregulierung von WDR42A in C2C12 Myotuben ebenfalls zu Atrophie-Resistenz führen könnte.

Um diese These zu überprüfen, wurde zunächst mittels spezifischer siRNA überprüft ob WDR42A (DCAF8) in C2C12 Myotuben herunterreguliert werden kann. Wie in Abbildung 45 zu sehen ist konnte die WDR42A Proteinmenge effektiv in C2C12 Myotuben verringert werden. Des Weiteren zeigt Abbildung 45, dass die Atrophie-Induktion mittels Dexamethason (10 μ M, 24 h) nicht wie in dem Denervations-Maus-Modell zu einer gesteigerten WDR42A Synthese in C2C12 Myotuben führt. Nichtsdestotrotz wurde dieses Modellsystem im weiteren Verlauf verwendet.

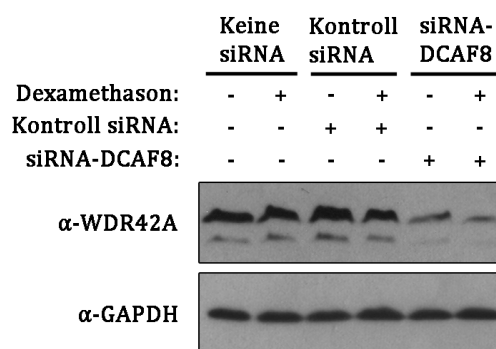


Abbildung 45: siRNA-vermittelte Herunterregulation von WDR42A in C2C12 Myotuben. C2C12 Myoblasten wurden 6-7 Tage lang zu Myotuben differenziert, äquivalente Mengen lysiert und anschließend im Immunblot analysiert. Detektion im Immunblot mit α -WDR42A (-Kaninchen) und α -GAPDH (-Maus) als Ladekontrolle. In den mit siRNA-DCAF8 behandelten Myotuben (+/- Dex) geht die WDR42A Expression um ca. 85% herunter verglichen mit beiden Kontrollen. Die Expression von WDR42A ändert sich nicht durch Dexamethason-induzierte Atrophie in C2C12 Myotuben.

In den nachfolgenden Experimenten wurde Atrophie durch Vermessung des C2C12 Myotubendurchmessers ermittelt. Umso stärker der Myotubendurchmesser abnimmt, desto mehr Atrophie wurde in den Myotuben induziert. Im C2C12 Atrophie-Resistenz Experiment wurden als erste Kontrolle unbehandelte C2C12 Myotuben (ohne siRNA-Transfektion) verwendet, um zu zeigen, dass in diesen Zellen Atrophie induziert werden kann. Wie in Abbildung 46 zu sehen ist konnte Atrophie effektiv in nicht mit siRNA transfizierten C2C12 Myotuben induziert werden. Der durchschnittliche

Myotubendurchmesser der C2C12 Myotuben ging von 29 μm auf 19 μm in mit Dexamethason behandelten Myotuben herunter. Dies entspricht einer Reduktion des Myotubendurchmessers von 35%. Als zweite Kontrolle wurden C2C12 Myotuben mit einer Scrambled siRNA-Kontrolle, bestehend aus einem Gemisch von vier verschiedenen unspezifisch bindenden siRNAs behandelt, um zu zeigen, dass die siRNA-Transfektion keinen Einfluss auf die Ausbildung der Atrophie hat. Der mittlere Myotubendurchmesser verminderte sich in diesen Kontrollen von ca. 29 μm auf 17 μm , was einer Reduktion von 41% entspricht. Somit konnten unspezifische Effekte durch die siRNA Transfektionen ausgeschlossen werden (Abbildung 46). Letztendlich wurde WDR42A in C2C12 Myotuben durch siRNA herunterreguliert und beobachtet ob sich in diesen Zellen im gleichen Maße Atrophie bilden kann. In Myotuben, in denen mit siRNA gezielt WDR42A Protein herunterreguliert wurde, konnte eine verminderte Atrophie-Induktion beobachtet werden. Der durchschnittliche Myotubendurchmesser minderte sich nur leicht von 27 μm auf 24 μm . Dies entspricht einer Reduktion von 9%. Daraus folgt, dass Myotuben in denen kein oder weniger WDR42A vorhanden ist signifikant weniger Atrophie bilden.

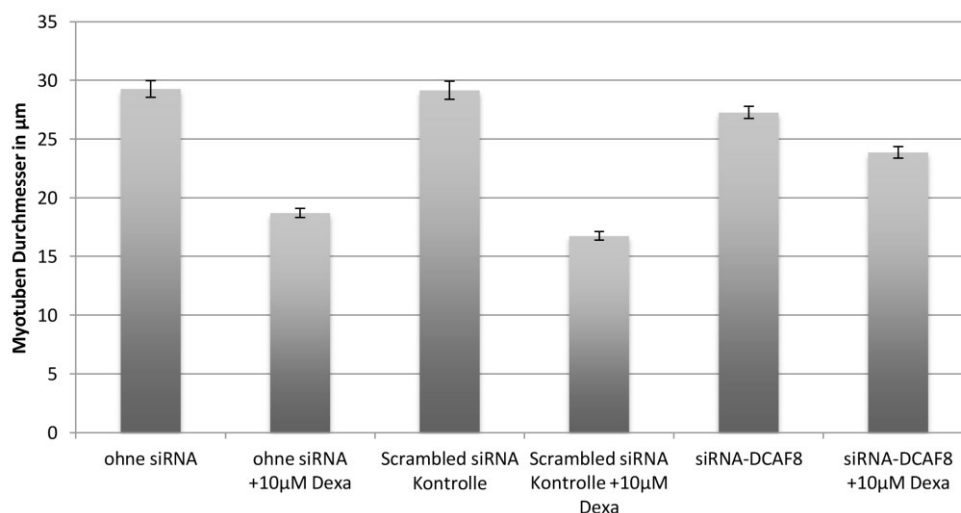


Abbildung 46: siRNA-vermittelte Herunterregulation von WDR42A in C2C12 Myotuben führt zu Atrophie-Resistenz. In siRNA unbehandelten Myotuben und Scrambled siRNA Kontrollen kann Atrophie induziert werden. In Myotuben in denen WDR42A herunterreguliert wurde, kommt es zu einer verminderten Atrophie-Bildung.

Als zweite statistische Auswertungsmethode wurden die in den einzelnen Versuchen gemessenen Myotubendurchmesser in 5 μm Gruppen zusammengefasst (z.B. 0-5 μm , 5-10 μm usw.). Anschließend wurden diese Gruppen in einem Balken- und einem Kurvendiagramm der Größe nach (von klein nach Groß) dargestellt. Dies führt zu einer bestimmten, glockenkurven ähnlichen, Größen-Verteilungskurve. Induktion von

Atrophie führt in diesem Modell zu einer Verschiebung der Größen-Verteilungskurve nach links, da insgesamt mehr kleinere Myotuben nach Ausbildung von Atrophie gemessen werden können. Wie in Abbildung 47 zu sehen ist, kommt es zu einer Links-Verschiebung der Größen-Verteilungskurve nach Atrophie-Induktion in den unbehandelten C2C12 Myotuben und den Scrambled siRNA-Kontrollen. Diese Verschiebung der Größen-Verteilungskurven ist in C2C12 Myotuben nach WDR42A Herunterregulation und Atrophie-Induktion kaum zu sehen. Dies bestätigt die aufgestellte Annahme, dass falls weniger WDR42A vorhanden ist C2C12 Myotuben Atrophie-Resistenz aufweisen.

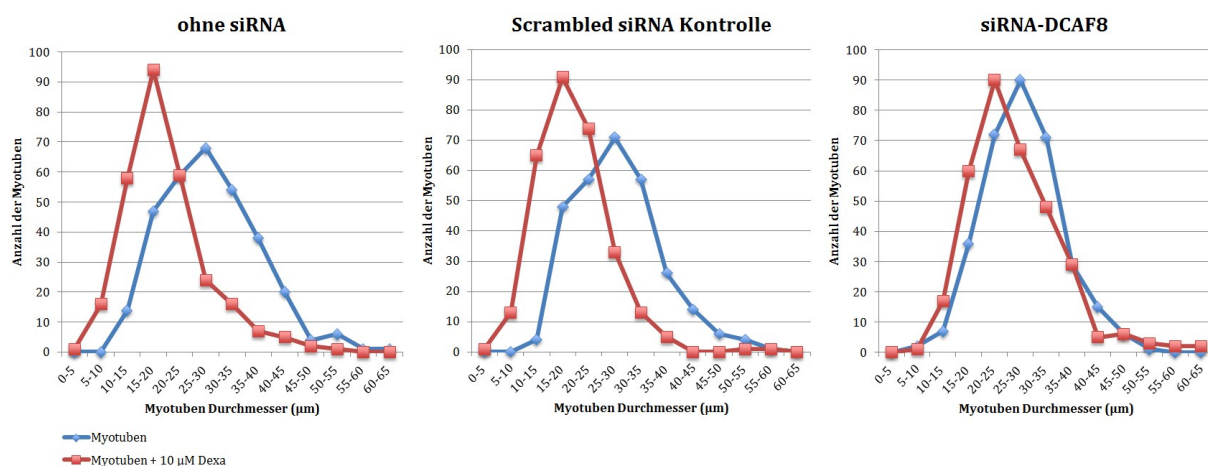


Abbildung 47: siRNA-vermittelte Herunterregulation von WDR42A führt zu Atrophie-Resistenz in C2C12 Myotuben. Die in dem dargestellten siRNA-Atrophie-Resistenz-Experiment gemessenen Myotubendurchmesser wurden in 5 µm Gruppen zusammengefasst und jeweils in einem Balken bzw. Kurvendiagramm der Größe von klein nach groß dargestellt. In siRNA unbehandelten Myotuben (ohne siRNA) und Scrambled siRNA Kontrollen kann Atrophie induziert werden. Dies ist charakterisiert durch Verschiebung der Größen-Verteilungskurven nach links. In Myotuben in denen WDR42A herunterreguliert wurde, kommt es zu keiner Verschiebung der Kurve nach links und somit auch zu einer verminderten Atrophie-Bildung.

Zusammengefasst konnte mit WDR42A ein neuer MuRF-Interaktionspartner identifiziert werden, der ebenfalls im Muskelgewebe und in Muskelzellen hergestellt wird. Außerdem wurde dargestellt, dass WDR42A wie MuRF1 durch Denervations-induzierte Atrophie im Skelettmuskel merklich hochreguliert ist und dass die Verminderung der WDR42A-Proteinmenge gleichfalls zu einer Resistenz gegenüber Atrophie-Ausbildung in C2C12-Myotuben führt. Diese Ergebnisse deuten an, dass WDR42A einen entscheidenden Einfluss auf die Funktion von MuRF1 hat.

4 Diskussion

Der Ubiquitin abhängige proteasomale Abbau von Proteinen des Muskelgewebes wird hauptsächlich durch MuRF E3-Ubiquitin-Ligasen vermittelt [32, 40, 42, 47, 51]. Es wird vermutet, dass die MuRF-Proteine wie andere E3-Ubiquitin-Ligasen in Multiproteinkomplexen organisiert sind. Ziel der Arbeit war es, neue MuRF-Interaktionspartner (Iap) zu entdecken und deren Funktion im Komplex zu beschreiben. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Methoden (Y2H und SILAC-AP-MS) verwendet.

4.1 Identifizierung neuer MuRF-Interaktionspartner

4.1.1 Identifizierung neuer MuRF-Iap durch Hochdurchsatz Y2H-Screenings

Um neue MuRF-Iap zu entdecken, wurde als erste Technik ein modifiziertes matrixbasiertes und automatisiertes Hochdurchsatz (*high throughput*) Y2H-screening-Verfahren der AG Wanker (MDC) angewandt [55, 58]. Die Vorteile von klassischen Y2H-Screenings ist die Identifizierung von binären Protein-Protein Interaktionen (PPI) unter annähernd eukaryotisch physiologischen Bedingungen, da Proteine in der Hefe einerseits posttranslational modifiziert werden und andererseits durch Chaperone ihre physiologische Faltungsstruktur erhalten [56]. Allerdings kann sowohl die Spezifität der posttranslationalen Modifikationen (PTMs) als auch die Faltung der Proteine von den eukaryotischen Bedingungen abweichen. Deshalb werden häufig auch falsche oder nicht vorhandene PPI erfasst. Des Weiteren kann die Gewebe- oder Organell-Spezifität und der Zeitpunkt der Synthese der interagierenden Proteine Einfluss auf die Identifizierung von PPI haben. Häufig interagieren Köder- und Beute-Proteine im Y2H miteinander, obwohl sie unter physiologischen Bedingungen nicht im selben Gewebe oder Organell vorhanden sind, oder zu unterschiedlichen Zeitpunkten, beispielsweise während der Entwicklung oder des Zellzykluses, hergestellt werden. Daher muss jede mit dem Y2H-System gefundene PPI bis zur Bestätigung durch weiterführende Experimente kritisch betrachtet werden. Ein Vorteil der hier angewendeten Y2H-Methode ist die Verwendung einer Matrix-basierten auf Mikrotiterplatten aufgetragenen Einzel-Klon-Bibliothek. Dies hat den Vorzug, dass jedes Einzelexperiment einem gezielten Interaktionstest

entspricht, da beide zu testenden Interaktionspartner bekannt sind. In vorangegangenen Studien wurden die MuRF-Proteine bereits als Köder in Y2H-Systemen verwendet, jedoch lediglich im kleinen Maßstab gegen Herz- oder Skelettmuskel cDNA-Bibliotheken getestet [34, 35, 73]. In den verwendeten cDNA Bibliotheken sind cDNAs, die für strukturelle Proteine kodieren (z.B. Myosin, Troponine und Titin) überrepräsentiert. Demgegenüber sind Signalproteine und Kinasen unterrepräsentiert. Des Weiteren bestehen die in diesen Arbeiten verwendeten gewebespezifischen Bibliotheken aus einem zufälligen Gemisch zunächst unbekannter Beute-cDNAs. Diese Beute-cDNAs setzen sich zusammen aus zufälligen cDNA-Fragmenten, Bruch- bzw. Teilstücken von *open reading frames* (ORFs, dt. offener Leserahmen) und vollständigen ORFs. Nach Durchführung der Y2H-Screens müssen die cDNAs der interagierenden Proteine aus den positiv selektierten Hefe-Klonen extrahiert und durch Sequenzierung identifiziert werden. Diese zeitaufwendige Prozedur ist mit unserer Methode nicht erforderlich, da jede getestete cDNA bekannt ist. Die verwendete Einzel-Klon-Bibliothek besteht aus insgesamt ca. 23.000 Klonen, wodurch ca. 75% des proteinkodierenden Bereichs des menschlichen Genoms abgedeckt wird. Von diesen Klonen liegen ca. 14.000 Klone als volle Länge cDNAs vor. Des Weiteren ist die verwendete Einzel-Klon-Bibliothek nicht auf Muskelgewebe spezialisiert, wodurch die Gefahr muskelspezifisch falsch-positive Klone zu entdecken, wie durch Verwendung einer Muskel cDNA-Bibliothek gegeben, reduziert ist. Ein weiterer Vorteil ist, dass Interaktionen mit gering synthetisierten Proteinen identifiziert werden können. Durch die Verwendung automatisierter Roboter-basierter Systeme war es zudem möglich im Hochdurchsatz alle 23.000 Einzel-Klone gegen jedes MuRF-Köderprotein insgesamt vier Mal zu testen. Aufgrund dessen konnte ein sogenannter Y2H-Score, berechnet aus der Häufigkeit der Identifizierungen, gebildet werden. Je höher dieser Score ist, umso wahrscheinlicher ist die festgestellte Interaktion. Zusätzlich wurden einzelne, höchstwahrscheinlich unspezifisch MuRF-interagierende Proteine aus den Ergebnissen herausgefiltert, da diese in vorangegangenen Screens sehr häufig identifiziert wurden und daher wahrscheinlich unspezifisch sind.

Um die Detektion unspezifischer Interaktionen zu reduzieren, wurden vor den Screens Autoaktivitätstests mit den Köder-Konstrukten durchgeführt (Abschnitt 3.1.1). In diesen Tests zeigte sich, dass volle Länge MuRF1 und 2 aufgrund der Autoaktivierung des Y2H-Systems nicht verwendet werden konnten (Tabelle 20). Da trotzdem neue MuRF1 und 2

Iap identifiziert werden sollten, wurden verschiedene MuRF-Domänen-Teilkonstrukte hergestellt (Abbildung 4). Autoaktivitätstest mit diesen Konstrukten ergaben, dass C-terminale Domänen-Teilkonstrukte ebenfalls nicht verwendet werden konnten, N-terminale hingegen schon. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der C-terminale Teil von MuRF1 und 2 für die Autoaktivierung der MuRF1 und 2 volle Länge Konstrukte verantwortlich ist. Solche Ergebnisse wurden in vorangegangenen Studien nicht gemacht und aufgrund dessen MuRF1 und 2 jeweils als volle Länge Proteine getestet [34, 35, 73]. Dies erhöht nach dem jetzigen Ergebnisstand die Wahrscheinlichkeit, falsche MuRF-PPI zu identifizieren.

In den Y2H-Screens wurden insbesondere mit MuRF1 und 2 sehr viele neue potentielle Interaktionspartner gefunden. Insgesamt wurden 251 unterschiedliche Proteine mit MuRF1 und 2, sowie 78 mit MuRF3-volle Länge und 32 mit MuRF3-Cc-AR identifiziert. Ein Erklärungsansatz hierfür ist, dass die MuRFs E3-Ubiquitin-Ligasen sind und deshalb viele potentiell mögliche Substrat-Proteine binden könnten. Auch wenn viele der PPI unter physiologischen Bedingungen, beispielsweise aufgrund von unterschiedlichen Gewebeexpressionsmustern oder differierenden subzellulären Lokalisationen nicht stattfinden können, binden die MuRFs diese Proteine im Y2H als Substrat-Proteine. Bisher wurde insbesondere für MuRF1 eine *in vivo* und *in vitro* Ubiquitinierungsaktivität nachgewiesen [40, 42, 51]. Dies könnte erklären warum mit MuRF1 sehr viel mehr PPI aufgefunden werden konnten.

Der Vergleich aller identifizierten Proteine zeigte, dass insbesondere mit MuRF1 und 2 sehr viele (147 von 251) ähnliche Proteine detektiert wurden (Abbildung 5). Diese unterschieden sich stark von den mit MuRF3 gefundenen Proteinen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MuRF1 und 2 ähnliche Proteine binden, welche sich jedoch stark von den MuRF3-Iap unterscheiden. Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, beinhaltet jeder der durchgeführten MuRF1 und 2 Domänen-Teilkonstrukte Screens, die im N-terminalen Bereich gelegene hoch homologe MFCD-Domäne. Die hohe Übereinstimmung der identifizierten MuRF1 und 2 Iap führen zu der Vermutung, dass die Mehrzahl der neu gefundenen Bindungspartner mit der MFCD-Domäne von MuRF1 und 2 interagieren.

In den aufgeführten Y2H-Screens (Abschnitt 3.1.1) konnten bereits bekannte publizierte MuRF-Iap wie beispielsweise TCAP, UBE2I, USP13, PKM2, UCHL3, und RNF10 entdeckt werden. Die Identifizierung dieser bereits bekannten MuRF-Iap zeigt eindeutig das hohe

Maß an Spezifität der Y2H-Screens. Aufgrund dessen gehen wir davon aus, dass einige der neuen MuRF-Iap auch echte Bindungspartner sind. Einige dieser möglichen neuen MuRF-Iap wurden für weitere Validierungen ausgesucht. Die Selektion dieser Proteine wird im Abschnitt 4.1.3 näher diskutiert.

4.1.2 Identifizierung neuer MuRF-Iap durch SILAC-AP-MS

Als zweite Technik zur Identifizierung neuer MuRF-Iap wurde SILAC-AP-MS angewandt [74-78]. Der entscheidende Grund für die Durchführung war die Hypothese, dass Proteine, die mit zwei verschiedenen Methoden (Y2H und SILAC-AP-MS) entdeckt würden, mit höherer Wahrscheinlichkeit physiologische Bindungspartner darstellen.

Mit der Y2H-Methode können ausschließlich binäre PPI, die in der Wirbeltier divergenten Hefe auftreten, identifiziert werden. Somit besteht die Gefahr, dass PPI, die auf gewebespezifischen Expressionen, Entwicklungsstadien, PTM und Faltungsstrukturen der Wirbeltiere beruhen, nicht entdeckt werden können. Aufgrund der Tatsache, dass die MuRF-Proteine muskelspezifisch hergestellt werden, sollte somit als zweite Technik zur Auffindung neuer Interaktionspartner SILAC-AP-MS mit Muskelzellen durchgeführt werden.

In einem klassischen AP-MS Experiment wird das zu untersuchende Protein über eine Affinitätssäule zusammen mit den Bindungspartnern und assoziierten Proteinen gereinigt und diese anschließend mittels MS identifiziert. Da bei klassischen AP-MS Versuchen immer auch Proteine entdeckt werden, die unspezifisch an die verwendete Affinitätssäule binden, wurde die klassische AP-MS Methode mit der SILAC Methode (SILAC-AP-MS) kombiniert, um zusätzlich die Spezifität der Screens zu erhöhen. Mit der SILAC Methode konnten Proteine, die unspezifisch an die Affinitätssäule binden von spezifischen MuRF-Interaktionen unterschieden werden.

Mit SILAC-AP-MS können im Gegensatz zum Y2H zusätzlich zu binären auch sekundäre Interaktionen identifiziert werden. Mit dieser Methode können ganze zusammenhängende MuRF-Proteinkomplexe, die aus Zellgemischen gereinigt wurden, identifiziert werden. Damit einhergehend stellt sich jedoch auch die Problematik, dass sekundär interagierende Proteine einerseits Bestandteile des MuRF-Proteinkomplexes, aber auch andererseits unspezifisch ko-präzipitierte Bindungspartner der eigentlichen MuRF-Iap darstellen können. Aufgrund dessen kann zunächst nicht präzise zwischen

direkten und indirekten MuRF-Wechselwirkungen unterschieden werden. Andererseits kann die SILAC Anreicherung der identifizierten Proteine im Experiment Hinweise darauf geben, ob es sich bei dem entdeckten Protein um einen direkten oder indirekten Bindungspartner handelt. Direkte MuRF-Interaktionspartner sollten wesentlich stärker angereichert sein als indirekt bindende Proteine. Zusammenfassend muss wie auch im Y2H jede im SILAC-AP-MS Experiment gefundene Interaktion bis zur Validierung mittels anderer Methoden kritisch betrachtet werden.

Für die Durchführung des SILAC-AP-MS Experimentes wird eine Mindestmenge Protein für die verlässliche Detektion der präzipitierten MuRFs und assoziierten Faktoren benötigt. Vorversuche zeigten, dass die hergestellte MuRF1 Proteinmenge geringer als die von MuRF2 oder 3 (Abschnitt 3.1.2) war und nicht für eine verlässliche MS-Detektion ausreichen würde. Da für andere E3-Ubiquitin-Ligasen Autoubiquitinierungsaktivität und ein damit verbundener verstärkter UPS-abhängiger Proteinabbau gezeigt werden konnte [66-68], wurde die Hypothese aufgestellt, dass auch die MuRFs ihre eigene Degradation kontrollieren. Des Weiteren wurde prognostiziert, dass MuRF1 eine höhere Autoubiquitinierungsaktivität als die Familienmitglieder MuRF2 und 3 aufweist. Diese Annahmen wurden in Überexpressionsstudien mit gleichzeitiger Inhibierung des Proteasoms bestätigt (Abbildung 8). Aufgrund dessen wurde in den MuRF1 SILAC-AP-MS Experimenten der proteasomale Abbau von MuRF1 durch MG132 unterbunden.

Wie in Abschnitt 3.1.2 (Tabelle 24) dargestellt, konnten in den durchgeführten Experimenten mit MuRF1 die meisten Proteine (Screen 1: 131, Screen 2: 98) mit einer Anreicherung über 1,5 (H/L Ratio) identifiziert werden. Im Vergleich dazu wurden mit MuRF2 (Screen 1: 35, Screen 2: 37) und mit MuRF3 (Screen 1: 15, Screen 2: 29) weniger Proteine gefunden. Diese Ergebnisse sind analog zu den Y2H-Screens in denen ebenfalls mit MuRF1 (und MuRF2) erheblich mehr positive Klone identifiziert wurden als mit MuRF3. MuRF1 könnte mehr Interaktionspartner als MuRF2 und 3 besitzen aufgrund der Tatsache, dass für MuRF1 als einziges MuRF-Protein bisher eine Ubiquitinierungsaktivität nachgewiesen werden konnte [40, 42, 51]. Aufgrund dessen könnte MuRF1 dementsprechend mehr Proteine, insbesondere Substrat-Proteine, binden. Als zweiter Grund ist anzumerken, dass in den MuRF1 Screens MG132 als Proteasom-Inhibitor verwendet wurde. Daraus resultiert, dass alle polyubiquitinierten

Proteine nicht durch das Proteasom abgebaut wurden und folglich in der Zelle akkumulierten. Diese Bedingungen könnten die Entstehung von unspezifischen PPI insbesondere unter Beteiligung von E3-Ubiquitin-Ligasen unterstützen. Aufgrund dessen wurden höchstwahrscheinlich einige unspezifische MuRF1 Interaktionen detektiert, die unter physiologischen Bedingungen nicht entstehen würden.

Des Weiteren konnte vergleichbar zu den Y2H-Screens beobachtet werden, dass mit MuRF1 und 2 sehr viele ähnliche Interaktionspartner entdeckt wurden, die sich erheblich von den mit MuRF3 identifizierten unterschieden (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse deuten an, dass MuRF1 und 2 ähnliche Proteine binden und im Vergleich zu MuRF3 funktionell verwandter sind.

In den SILAC-AP-MS Analysen wurde mit MuRF1 u.a. auch MuRF2 als Interaktionspartner identifiziert. Wie in vorangegangenen Studien bereits angedeutet, können die MuRFs Homo- und Heterooligomere bilden [17, 50, 79]. In den Screens wurde lediglich die MuRF1 MuRF2 Heterooligomerisierung gefunden. Der Einfluss der Heterooligomerisierung auf die Funktionalität der MuRF-Proteine wurde zusätzlich mit Ko-IP, Ko-Expression sowie MuRF-MuRF-Lokalisationsstudien untersucht. Die Ergebnisse werden in Abschnitt 4.2.2 näher diskutiert.

Mit den SILAC-AP-MS Screens wurden ebenfalls bekannte MuRF-Iap (TNNC, NEB, FHL-1, FLN C, PKM2, SQSTM1 und UBC) entdeckt. Die Identifizierung dieser bekannten Interaktionspartner und die Korrelationen zu den Y2H-Screens zeigen das hohe Maß an Spezifität der SILAC-AP-MS Screens. Aufgrund dessen könnten andere gefundene bisher unbekannte Proteine ebenfalls echte MuRF-Iap darstellen. Einige dieser Proteine wurden für weitere Validierungen und Charakterisierungen selektiert (Abschnitt 4.1.3).

4.1.3 Zwei unterschiedliche Screening-Methoden führen zur Identifizierung von elf neuen MuRF-Interaktionspartnern

Ein zentraler Aspekt dieser Arbeit war es die mittels Y2H und SILAC-AP-MS gewonnen Datensätze zu vergleichen, um besonders wahrscheinliche MuRF-PPI zu erkennen. Vorhergehende Studien zeigten, dass die Übereinstimmung zwischen diesen beiden Methoden sehr gering, aber komplementär ist [80-83]. Somit stellte ich die Hypothese auf, dass Proteine, die mit beiden Methoden verlässlich gefunden würden, eine

besonders hohe Wahrscheinlichkeit aufweisen sollten, physiologische MuRF-Iap darzustellen.

Ein Vergleich der beiden gewonnen Datensätze zeigte, dass 43 Proteine mit beiden Methoden als potentielle MuRF-Iap gefunden wurden. Verglichen mit der Gesamtmenge der identifizierten potentiellen MuRF-Iap war somit die Menge der in beiden Screens entdeckten Proteine wie erwartet gering. Es wurden 1,6% (43 von 2695) der im Y2H erfassten Proteine auch im SILAC-AP-MS identifiziert. Andersherum wurden 9% (43 von 478) der im SILAC-AP-MS aufgefundenen Proteine ebenfalls im Y2H entdeckt. Der geringe Grad an Übereinstimmung kann zum einen durch die Verwendung der unterschiedlichen Expressionssysteme (Hefe oder Rattenkardiomyozyten) und zum anderen durch die angewandten unterschiedlichen Techniken mit ihren bereits diskutierten Vor- und Nachteilen (Y2H oder SILAC-AP-MS) erklärt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass mittels Y2H eher kurzlebige transiente oder auch schwache Wechselwirkungen und mit AP-MS eher starke langlebige und überrepräsentierte Interaktionen identifiziert werden können [80]. Nichtsdestotrotz wird angenommen, dass Proteine, die mit beiden Techniken erfasst werden mit hoher Wahrscheinlichkeit physiologische Interaktionspartner sein könnten.

Anschließend sollten ausgewählte neu entdeckte potentielle MuRF-PPI bestätigt und charakterisiert werden. Die Auswahl erfolgte über zwei Kriterien: 1. Proteine, die mit beiden Methoden, mit hohen Y2H-Scores bzw. starker SILAC-AP-MS Anreicherung entdeckt wurden und 2. Proteine, die nur mit einer der beiden Methoden gefunden wurden, aber in ihren individuellen Experimenten hohe Y2H-Scores/SILAC-AP-MS Anreicherungen aufwiesen oder aber auf Grund der verfügbaren Literatur von besonderem Interesse waren.

Dazu wurden als erstes mit WDR42A und VCP zwei Proteine ausgewählt, die mit beiden Methoden und hohem Y2H-Score und SILAC-AP-MS Anreicherung identifiziert wurden. Die meisten anderen der 43 mit beiden Ansätzen erfassten Proteine erfüllten diese Kriterien nicht. Ein Teil der 43 Proteine wurde im Y2H als höchstwahrscheinlich falsch-positiv vorbewertet (z.B. PRDX5, RPL27A, und ZNF655). Andere Proteine wiesen schlechte Anreicherungen in den SILAC-AP-MS Experimenten (z.B. RBM15B, MICAL2 und PRMT5) oder geringe Scores im Y2H auf (z.B. PRMT5, PABPC3 und DVL3).

Zusätzlich wurden mit TNFAIP1, WDR42A, USP35, MYLK2, VCP, HDAC10, DUSP16 und FBXW2 Proteine selektiert, die hohe Y2H-Scores aufwiesen. Des Weiteren wurden mit UBE2I, UBE2E3, WDR42A, WDR23, USP35, USP13, VCP, FBXW2, G2E3 und UCHL3 Proteine ausgewählt, die mit dem UPS-abhängigen Proteinabbau in Verbindung gebracht wurden. Für einige der ausgesuchten Proteine wie UBE2I, UBE2E3, WDR42A, WDR23, USP35, USP13, UCHL3 und FBXW2 wurde zusätzlich eine Assoziierung zu E3-Ubiquitin-Ligase Multiproteinkomplexen nachgewiesen oder aufgrund von Homologien vermutet. Es wird angenommen, dass WDR42A, WDR23 und FBXW2 als Substrat-Adapter-Proteine fungieren können. UBE2I und UBE2E3 sind E2 Ubiquitin-konjugierende Enzyme, die mit den MuRFs interagieren und das gebundene Ubiquitin auf Substrat-Proteine übertragen könnten. Des Weiteren wurden mit UCHL3, USP35 und USP13 deubiquitinierende Proteine, die den Ubiquitinierungsprozess durch Abspalten des Ubiquitins vom Substrat-Protein rückgängig machen können, selektiert. Außerdem wurden MYLK2, TCAP, UCHL3, USP35 und CAPN3 aufgrund ihrer Expression und Funktionalität im Muskelgewebe ausgesucht. Mit TCAP, UBE2I und USP13 wurden drei Proteine als interne Kontrollen ausgewählt, da diese Proteine bereits als MuRF-lap beschrieben wurden. UCHL3 wurde aufgrund seiner verstärkten Synthese im Muskelgewebe und seiner Aktivität als deubiquitinierendes Enzym (DUB) ausgewählt. Die Interaktion von UCHL3 mit allen MuRF-Proteinen konnte im Verlauf dieser Arbeit durch Loch et al. (2012) nachgewiesen werden [62].

Im Anschluss wurden die 27 selektierten Proteine auf Wechselwirkung mit den MuRF-Proteinen in Ko-IP-Experimenten getestet. Insgesamt konnten elf der getesteten Proteine eines oder mehrere der MuRF-Proteine ko-präzipitieren. Die meisten der Ko-IP positiven Proteine (WDR42A, USP35, MYLK2, HDAC10 und PCDHGB1) wiesen auch einen hohen Y2H-Score (0,67) auf. Demgegenüber waren Proteine, die einen geringeren Y2H-Score aufwiesen wie RELT (0,33) oder G2E3 (0,25) Ko-IP negativ. Es konnten aber auch Interaktionen zu Proteinen mit geringeren Y2H-Scores wie z.B. FBXW2 (0,42) nachgewiesen werden. Einige MuRF-PPI konnten trotz hoher Y2H-Scores nicht nachgewiesen werden wie z.B. TNFAIP1 (0,67). Zusammenfassend zeigte sich aber eine klare Korrelation zwischen Klonen mit hohen Y2H-Scores und positiven Ko-IPs. Dies legt wiederum erneut die Spezifität und Qualität der Y2H-Screens dar.

4.2 Charakterisierung ausgewählter MuRF-Interaktionspartner

4.2.1 Thesen zur funktionellen Bedeutung einiger neuer MuRF-Iap

Die Funktion einiger neuer MuRF-Iap sollte hinsichtlich deren Bedeutung in einem putativen MuRF-Multiproteinkomplex untersucht werden. Dazu wurden CHX-Abbau-Experimente durchgeführt mit denen die Stabilität der interagierenden Proteine über einen definierten Zeitraum untersucht wird. Aufgrund einer Analyse des Stabilitätsverhaltens im CHX-Abbau-Experiment durch Ko-Expression beider interagierender Proteine, sollten Hypothesen zu möglichen funktionellen Bedeutungen der Interaktionen aufgestellt werden. Beispielsweise sollte die Ko-Expression von MuRF-Substraten mit den MuRF-Proteinen zur Herabsetzung der Substratstabilität im CHX-Abbau-Experiment führen.

Mit HDAC10 und USP35 wurden zwei mögliche MuRF1 Substrat-Proteine identifiziert. In den CHX-Abbau-Experimenten zeigte sich eine verminderte Stabilität beider Proteine nach Ko-Expression mit MuRF1 (Abbildung 15). Es wird davon ausgegangen, dass USP35 aufgrund seiner Homologie zu anderen USP-Proteinen ein DUB-Protein ist. Somit kann USP35 eine duale Rolle im MuRF-Multiproteinkomplex zukommen. Einerseits könnte USP35 die Deubiquitinierung von MuRF-Substrat-Proteinen oder eine Ubiquitinierung der MuRF-Proteine selbst rückgängig machen. Andererseits deuten die CHX-Abbau-Experiment Ergebnisse auch darauf hin, dass USP35 zusätzlich ein MuRF1-Substrat-Protein darstellen könnte. Zukünftige Experimente mit rekombinantem HDAC10 und USP35 als Substrat-Proteine in *in vitro* MuRF1-Ubiquitinierungsassays könnten die aufgestellten Behauptungen bestätigen. Die Ko-Expression von MuRFs und MYLK2 führte zu einer verminderten Stabilität von MuRF1, jedoch nicht von MuRF2 oder MuRF3 (Abbildung 14). Diese Ergebnisse zeigen, dass MYLK2 spezifisch die Stabilität von MuRF1 beeinflusst. Da MYLK2 eine muskelspezifische Kinase ist und für andere E3-Ubiquitin-Ligasen bereits eine Regulation der E3-Ubiquitin-Ligase-Aktivität durch Phosphorylierung gezeigt werden konnte [84], postulierte ich, dass MYLK2 MuRF1 spezifisch phosphoryliert und damit dessen Aktivität reguliert (weitere Diskussion siehe Abschnitt 4.2.3). Bezüglich der MuRF1-WDR42A Interaktion wurden, aufgrund von publizierten Arbeiten zu WDR42A homologen Proteinen [70, 85] die Arbeitsthese aufgestellt, dass WDR42A als Scaffolding-Protein oder Substrat-Adapter-Protein fungieren könnte bzw. das MuRF1 ein Substrat eines CRL4^{DCAF8} Komplexes sein

könnte. In den CHX-Abbau-Experimenten mit MuRF1 und WDR42A waren beide Proteine alleine und zusammen exprimiert stabil. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die MuRF1-WDR42A Interaktion keinen Einfluss auf die jeweilige Stabilität der interagierenden Proteine hat. Substrat-Adapter-Proteine interagieren zum einen mit dem durch die E3-Ubiquitin-Ligase ubiquitinierten Substrat-Protein und zum anderen mit der Ligase selber und werden üblicherweise nicht durch das spezifische E3 ubiquitiniert. Sollte WDR42A als Substrat-Adapter- oder Scaffolding-Protein im MuRF-Multiproteinkomplex fungieren, kann davon ausgegangen werden, dass diese Interaktion keinen Einfluss auf die jeweilige Stabilität des Interaktionspartners haben sollte. Die CHX-Abbau-Experimente zeigen einerseits, dass WDR42A kein Substrat-Protein der MuRFs ist und andererseits nicht die Stabilität von MuRF1 beeinflusst. Somit indizieren diese Ergebnisse, dass WDR42A als Scaffolding-Protein in MuRF-Multiproteinkomplexen fungieren könnte.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden neue experimentelle Ansätze für die funktionelle Charakterisierung der MuRF-MYLK2 und insbesondere der MuRF-WDR42A sowie der in den SILAC-AP-MS identifizierten MuRF-MuRF Interaktionen entwickelt, die in den nachfolgenden Kapiteln näher diskutiert werden.

4.2.2 Heterooligomerisierungen beeinflussen die Funktion der MuRF-Proteine

MuRF2 wurde in den SILAC-AP-MS Screens als MuRF1 Interaktionspartner identifiziert (Tabelle 25). In aktuell publizierten Arbeiten wird darauf hingewiesen, dass alle MuRFs in der Lage sind Homo- und Heterodimere sowie Homo- und Heterooligomere miteinander zu bilden [17, 50, 79]. Diese Aussagen beziehen sich im Wesentlichen auf zwei Publikationen [32, 34]. Tatsache ist jedoch, dass in Spencer et al. (2000) [32] ausschließlich die MuRF3 Homooligomerisierung und in Centner et al. (2001) die MuRF1 Homodimerisierung sowie die Heterodimerisierung von MuRF1 mit MuRF3 beschrieben wurde [34]. In beiden Studien [32, 34] wurden die MuRF-MuRF Interaktionen ausschließlich mit *in vitro* translatierten MuRF-Fusionsproteinen untersucht und die Cc-Domäne als verantwortliche Region für die MuRF Di- und Oligomerisierungen identifiziert. Mittels Ko-IPs (Abbildung 16) konnte bestätigt werden, dass alle MuRFs miteinander interagieren. Kolokalisationsstudien bestätigten zusätzlich, dass alle MuRF-Proteine miteinander kolokalisieren (Abschnitt 3.2.2). Somit wurde zum ersten Mal mit *in vivo* synthetisierten und damit posttranslational

modifizierten MuRFs gezeigt, dass alle MuRFs miteinander interagieren. Die funktionelle Bedeutung der MuRF-MuRF Interaktionen wurde bisher nicht beschrieben.

Andere E3-Ubiquitin-Ligasen weisen eine starke Autoubiquitinierungsaktivität auf, welche die Ligase-Aktivität, die subzelluläre Lokalisation oder auch die Stabilität beeinflusst [66-68]. Die Autoubiquitinierung kann durch die Bindung eines Substrat-Proteins, durch PTMs wie z.B. Phosphorylierungen, durch DUBs oder aber auch durch die Bindung eines Komplex-Partners inhibiert werden [86]. Wie bereits dargelegt (Abschnitt 3.1.2) konnte in Überexpressionsstudien, in denen der proteasomale Proteinabbau mit MG132 gehemmt wurde, deutlich mehr MuRF-Protein (insbesondere MuRF1) detektiert werden (Abbildung 8), was auf eine starke Autoubiquitinierung der MuRFs hinweist. Da die MuRF-Proteine Homo- und Heterooligomere bilden und höchstwahrscheinlich Bestandteile von MuRF-Multiproteinkomplexen sind, wurde vermutet, dass MuRF-MuRF Interaktionen die Autoubiquitinierung kontrollieren und damit die Stabilität und Funktionalität regulieren. Erste Hinweise dafür lieferten Ko-Expressionsstudien mit MuRFs in COS-7 und C2C12 Zellen. Im Gegensatz zu COS-7 Zellen wurden die MuRFs durch Ko-Expression in C2C12 Skelettmuskelzellen stabilisiert (Abbildung 26). Insbesondere die MuRF1-MuRF3 Heterooligomerisierung führte zur Stabilisierung beider Proteine. Es könnte sein, dass die Heterooligomerisierung die Autoubiquitinierung der MuRF-Proteine durch aus der Bindung resultierenden Konformationsänderungen oder Blockierung von E2 Bindungsstellen inhibiert wird. Jedoch sind weiterführende Experimente notwendig, um diese Behauptung zu bestätigen. Beispielsweise könnte der Einfluss der Heterooligomerisierung auf die Stabilität der Proteine in CHX-Abbau-Experimenten überprüft und der Einfluss des UPS auf den Abbau mittels MG132 getestet werden. Zusätzlich könnte mittels Ubiquitinierungsassays der Einfluss der Heteromerbildung auf die Autoubiquitinierung untersucht werden.

In Kolokalisationsstudien zeigte sich, dass die Heteromerbildung die subzelluläre Lokalisierung einzelner MuRF-Proteine verändert (Abschnitt 3.2.2). MuRF1 GFP-Fusionsproteine zeigten unabhängig von der Position des verwendeten Protein-Tags eine Lokalisierung in kleinen punktförmigen Strukturen im Zytoplasma der verwendeten Zellen (Abbildung 17). Diese Lokalisierung wurde bereits in Zellkulturmodellen beschrieben und spekuliert, dass es sich dabei um MuRF1

Homooligomere handeln könnte [35]. Die Lokalisierung von MuRF2 wurde im Gegensatz zu MuRF1 durch die Position des verwendeten Protein-Tags beeinflusst. N-terminal RFP markiertes MuRF2 zeigte wie MuRF1 eine Lokalisierung in punktförmigen Strukturen im Zytoplasma (Abbildung 18). Dabei könnte es sich ebenfalls um zytoplasmatische MuRF2 Homooligomere handeln. Dem hingegen weist C-terminal RFP markiertes MuRF2 eine Lokalisierung in flächigen um den Zellkern verteilten filamentösen Geflechten auf (Abbildung 19). Da für MuRF2 eine Lokalisation und transiente Interaktion mit Mikrotubuli, Myosin und Titin während der Sarkomer-Entwicklung bereits gezeigt werden konnte [36, 38], könnte es sich bei den beschriebenen Lokalisationen ebenfalls um Mikrotubuli-Assoziationen handeln. Es wird vermutet, dass MuRF2 als Protein-Adapter zwischen Mikrotubuli, Myosin und Titin für die Entwicklung von Sarkomeren durch die Beteiligung an Myosin und Titin Transportvorgängen zum Sarkomer von entscheidender Bedeutung ist [36, 38]. Die genaue funktionelle Bedeutung der MuRF2 Mikrotubuli Interaktion ist unklar. Zusätzlich wurde C-terminal RFP markiertes MuRF2 in kleinen kreisförmigen bis hierhin nicht beschriebenen Strukturen beobachtet (Abbildung 19). Diese Strukturen ähneln nach meinem derzeitigen Wissen am ehesten Färbungen von *Lipid droplet* Proteinen wie beispielsweise Perilipin [87, 88]. Eine Assoziierung von MuRF2 mit *Lipid droplets* wurde bisher nicht beschrieben und in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. MuRF3 zeigte wie MuRF2 ebenfalls eine von der Position des Protein-Tags abhängige Lokalisierung. N-terminal RFP markiertes MuRF3 (Abbildung 20) lokalisiert in großen flächigen Aggregaten und C-terminal RFP markiertes MuRF3 lokalisiert in filamentösen Strukturen um den Zellkern (Abbildung 20). Für MuRF3 wurde bereits eine Assoziation mit Mikrotubuli beschrieben [32]. Aufgrund dessen könnte die beobachtete filamentöse Lokalisierung ebenfalls Mikrotubuli gebundenes MuRF3 darstellen. MuRF3 ist wichtig für die Differenzierung von Muskelzellen und schützt das Mikrotubuli-Netzwerk vor Alkaloid-, Kälte- und Kalzium-induzierter Depolymerisation [32]. Die genaue funktionelle Bedeutung der MuRF3 Mikrotubuli Lokalisation ist jedoch unklar. In den Ko-Expressionsstudien konnte überraschenderweise eine veränderte Anordnung von einzelnen MuRF-Proteinen nach Heterooligomerisierung mit Familienmitgliedern beobachtet werden. MuRF1 wird durch Heteromerbildung mit MuRF3 an Mikrotubuli rekrutiert (Abbildung 22). Diese Lokalisationsänderung wurde bisher nicht beschrieben. Daraus folgend könnte die Funktion von MuRF1 und/oder MuRF3 verändert werden.

Beispielsweise könnte die Autoubiquitinierungsaktivität von MuRF1 moduliert werden oder MuRF1 Mikrotubuli spezifische Funktionen zukommen. So könnte MuRF1 z.B. Proteine an den Mikrotubuli ubiquitinieren. Ähnliche Zusammenhänge könnten auch für die MuRF1 mit MuRF2 Kollokalisierung gelten (Abbildung 21). Auch MuRF2 wurde durch MuRF3 an Mikrotubuli rekrutiert (Abbildung 24). Da für beide Proteine schon Mikrotubuli spezifische Funktionen beschrieben wurden, vermute ich, dass beide Proteine redundant zusammenwirken. MuRF2 ist involviert in dem koordinierten Mikrotubuli abhängigen Sarkomer-Aufbau [36, 38] und MuRF3 stabilisiert Mikrotubuli [32]. Ich vermute ein kooperatives Zusammenwirken in diesen Prozessen.

4.2.3 MYLK2 potentielle Rolle bei der Regulation der MuRF1 Aktivität durch Phosphorylierung

In den mit MuRF3 durchgeführten Y2H-Screens wurde MYLK2 als neuer MuRF3-lap identifiziert (Abschnitt 3.1.1) und die Interaktion mittels Ko-IPs mit allen MuRFs bestätigt (Abbildung 12). MYLK2 ist eine Skelettmuskel-spezifische Kalzium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase, die ein Serin am N-Terminus der Myosin-leichte-Kette (MLC, *myosin light chain*) phosphoryliert. Diese Phosphorylierung ist für die regulative Kontraktion von Skelett- und Herzmuskel essentiell [89]. MYLK2 ist in Teilen zu der Serin/Threonin-Kinase-Domäne von Titin homolog [90]. Eine Interaktion von MuRF1 und 2 mit Titin in enger räumlicher Nähe zu der Titin-Kinase-Domäne konnte bereits gezeigt werden [34, 35]. Die spezifische Phosphorylierung von MuRF1 oder 2 durch die Titin-Kinase-Domäne konnte jedoch bisher nicht nachgewiesen werden. In dieser Arbeit führte die Ko-Expression von MYLK2 mit MuRF1 (jedoch nicht MuRF2 oder 3) in CHX-Abbau-Experimenten zu einer reduzierten MuRF1 Stabilität (Abbildung 14). Da für andere E3-Ubiquitin-Ligasen wie beispielsweise Parkin gezeigt wurde, dass Phosphorylierungen Einfluss auf die Aktivität der Ligase hat [84], wurde prognostiziert, dass MYLK2 MuRF1 phosphoryliert und damit dessen Aktivität reguliert. Weitere Hinweise für diese Behauptung lieferten Sequenzanalysen in Kombination mit Phosphorylierungs-Vorhersage-Programmen. Es konnte gezeigt werden, dass MuRF1 potentielle Ser/Thr-Phosphorylierungsstellen aufweist, die in MuRF2 oder 3 nicht zu finden sind (Abbildung 27). Diese Befunde waren im Einklang mit den Ergebnissen der CHX-Abbau-Experimente in denen MYLK2 nur die Stabilität von MuRF1, aber nicht von MuRF2 oder 3 reduzierte. Weiterführende Experimente konnten diese Annahme jedoch nicht verstärken. In den durchgeführten *mobility shift* Experimenten zeigte MuRF1 keine

Massenveränderung im SDS-Gel nach Ko-Expression von MYLK2 (Abbildung 28). Andererseits führt nicht jede Phosphorylierung zwangsläufig zu einer Größenveränderung im SDS-Gel [91]. Somit kann eine Phosphorylierung von MuRF1 durch MYLK2 zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden. Zukünftige *in vivo* oder *in vitro* Phosphorylierungsexperimente könnten zur Klärung dieser Fragestellung beitragen.

4.2.4 WDR42A als Regulator der MuRF1 abhängigen Skelettmuskelatrophie

In den durchgeführten Screens zur Findung neuer MuRF-Iap wurde WDR42A identifiziert (Abschnitt 3.1). Hervorzuheben ist, dass WDR42A mit beiden angewandten Methoden (Y2H und SILAC-AP-MS) gefunden wurde. WDR42A wurde in den Y2H-Screens mit MuRF3 und in den SILAC-AP-MS Screens mit MuRF1 und MuRF2 gefunden. Anschließend konnte die Interaktion von WDR42A mit MuRF1 und 3 spezifisch in Ko-IP Experimenten nachgewiesen werden (Abbildung 12). Zusätzlich konnte die Interaktion durch Kolokalisation der beiden Proteine (endogen und als überexprimierte GFP- bzw. RFP-Fusionsproteine) in immortalisierten C2C12 Skelettmuskelzellen dargestellt werden (Abschnitt 3.3.3). Diese Ergebnisse zeigen, dass WDR42A ein neuer Interaktionspartner von MuRF1 und 3 ist.

WDR42A oder auch DCAF8 (*DDB1 and CUL4 associated factor 8*) gehört zur Familie der WD40-Repeat Proteine und weist sieben dieser Strukturmodule auf [85]. WD40-Repeats bestehen aus ~40 Aminosäuren, welche oft mit einem Tryptophan-Asparaginsäure (W-D) Dipeptid enden [92]. Für andere Mitglieder der Proteinfamilie wurde gezeigt, dass sieben hintereinander angeordnete WD40-Repeats siebenblättrige zirkuläre β -Propeller-Strukturen (auch WD40-Domäne) bilden [70]. Aufgrund dessen könnte auch WDR42A diese β -Propeller-Struktur ausbilden. Bisher wurde für kein Protein, welches ausschließlich WD40-repeats aufweist, eine intrinsische enzymatische Aktivität nachgewiesen. Stattdessen koordinieren WD40-Repeat Proteine die Assemblierung von Multiproteinkomplexen als Scaffold-Proteine indem der zirkuläre β -Propeller als Protein-Interaktionsplattform für die einzelnen Proteine fungiert [70, 93]. Proteine, die den zirkulären β -Propeller binden, können dabei auf drei Interaktionsflächen, der Ober- und Unterseite sowie seitlich interagieren. WD40-Repeat Proteine können somit die Assemblierung und Regulation von Multiproteinkomplexen vermitteln. WD40-Repeat Proteine weisen nur einen geringen Sequenz-Konservierungsgrad auf und wurden mit

einer Vielzahl verschiedener zellulärer Prozesse wie der Signaltransduktion, Zellteilung, Zytoskelett Reorganisation und auch dem UPS in Verbindung gebracht [70]. Somit kann die Funktion von WDR42A als WD40-Repeat Protein nur im geringen Maße anhand der Sequenz annotiert werden. Ich stellte die These auf, dass WDR42A als Scaffolding-Protein die Assemblierung und Regulation von MuRF-Multiproteinkomplexen koordiniert.

WDR42A (DCAF8) wird außerdem zur *DDB1 and CUL4 associated factor* (DCAF) Proteinfamilie gezählt, die alle WD40-Repeats besitzen, die zusätzlich Bromo- (DCAF14), TPR- (DCAF9), IQ- (DCAF6), LisH- (DCAF1) oder Ring- (COP1) Domänen aufweisen können [85]. Alle Mitglieder dieser Proteinfamilie interagieren mit Cullin4A und B (Cul4A, Cul4B) und *DNA damage-binding protein 1* (DDB1) [85]. Deshalb wird vermutet, dass alle Familienmitglieder Teil von Cullin4-RING-Ubiquitin-Ligase (CRL4) Proteinkomplexen sind. In diesen Proteinkomplexen fungieren die DCAF-Proteine als Substrat-Adapter-Proteine [94]. Sie binden einerseits das Substrat-Protein und interagieren andererseits selbst mit DDB1 und Cul4, welches an die Ligase-Untereinheit Rbx1 bindet. Rbx1 seinerseits bindet ein mit Ubiquitin beladenes E2 Enzym, welches das Ubiquitin auf das Substrat-Protein überträgt. DCAFs wurden bisher ausschließlich als Substrat-Adapter-Proteine in CRL4 Komplexen im Verbund mit Cul4 und DDB1 beschrieben. Nichtsdestotrotz stellte ich die Theorie auf, dass WDR42A als Substrat-Adapter-Protein MuRF-Substrate bindet und an den MuRF-Multiproteinkomplex rekrutiert. Unter dieser Annahme besteht auch die Möglichkeit durch WDR42A Screens neue oder bereits bekannte MuRF-Substrat-Proteine zu finden. Andererseits besteht auch die Möglichkeit, dass MuRF-Proteine selbst Substrate in bisher unbekannten muskelspezifischen CRL4-Komplexen sein könnten. Cycloheximid-Abbau-Experimente mit überexprimiertem WDR42A und MuRF1 Fusionsproteinen deuteten jedoch nicht auf diesen Verdacht hin, da beide Proteine zusammen synthetisiert stabil sind (Abbildung 13). Jedoch muss angefügt werden, dass die CHX-Abbau-Experimente einerseits bisher ausschließlich mit Nicht-Muskelzellen (COS-7) und andererseits ausschließlich mit Fusionsproteinen und nicht mit endogenen Proteinen durchgeführt wurden. Aufgrund dessen kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass MuRF1 ein CRL4^{DCAF8} Substrat-Protein darstellt.

4.2.4.1 Ubiquitäres WDR42A weist gewebespezifische Expressionsmuster auf

Hinsichtlich einer funktionellen Charakterisierung der MuRF-WDR42A Interaktionen wurde überprüft, ob beide Bindungspartner unter physiologischen Bedingungen im gleichen Gewebe synthetisiert werden (Abschnitt 3.3.1). Da die MuRFs ausschließlich in der quergestreiften Muskulatur hergestellt werden, musste überprüft werden, ob WDR42A ebenfalls in diesen Geweben vorhanden ist. WDR42A wird ubiquitär in fast allen getesteten Geweben, also auch im Skelett- und Herzmuskelgewebe, hergestellt (Abbildung 29). Das heißt, dass eine Interaktion unter physiologischen Bedingungen möglich ist. Diese Ergebnisse zeigen auch, dass WDR42A eine Funktion in einer Vielzahl von Geweben haben könnte. Da andere DCAF-Proteine als Substrat-Adapter-Proteine in CRL4-Komplexen beschrieben wurden [85], könnte WDR42A ebenfalls gewebeunspezifisch als Substrat-Adapter-Protein in verschiedenen CRL4-Komplexen agieren. Nichtsdestotrotz könnte WDR42A zusätzlich zu ubiquitären Funktionen auch muskelspezifische Funktionen durch die Interaktion mit MuRF1 und 3 haben.

Diese These wurde durch die Identifizierung von verschiedenen und teilweise gewebespezifischen WDR42A Proteinvarianten bekräftigt. In der Online-Datenbank www.UniProt.org [71] sind für humanes Hs-WDR42A (UniProt ID: Q5TAQ9) zwei Isoformen (67 und 31 kDa) und für Mäuse Mm-WDR42A (UniProt ID: Q8N7N5) ebenfalls zwei Isoformen (66 und 46 kDa) beschrieben. Mit dem verwendeten polyklonalen WDR42A Antikörper können laut Hersteller zwei unterschiedlich große Hs-WDR42A Proteine (ca. 70 und 80 kDa) in HeLa und 293T Zelllysaten detektiert werden. Ich konnte mit 35, 50, 70 und 80 kDa vier unterschiedlich große WDR42A Proteinvarianten detektieren (Abbildung 29). Die Spezifität des benutzten WDR42A Antikörpers wurde durch siRNA-Herunterregulation der beiden großen 70 und 80 kDa WDR42A Proteine in C2C12 Zellen belegt (Abbildung 31). Diese Ergebnisse zeigen, dass beide 70 und 80 kDa Proteine spezifisch detektiertes WDR42A darstellen. Da die beiden im Mausmodell detektierten kleinen 35 und 50 kDa Proteine nicht in diesen Zellen detektiert wurden, kann nicht eindeutig bewiesen werden, dass diese WDR42A darstellen. Die vier WDR42A Proteine wurden zum Teil gewebespezifisch synthetisiert. Beispielsweise konnten in der Herzmuskulatur beide großen 70 und 80 kDa Proteine und in der Skelettmuskulatur vorzugsweise die 80 kDa Variante detektiert werden. Das 35 kDa große WDR42A wurde nur im Pankreas und der Leber gefunden. Zusätzlich wies das 70 kDa große WDR42A gewebespezifisch geringe Größenunterschiede auf

(Abbildung 29), was für eine gewebespezifische posttranslationale Modifikation sprechen könnte. Für andere WD40-Repeat sowie DCAF-Proteine konnten zahlreiche PTMs insbesondere Phosphorylierungen nachgewiesen werden, die Einfluss auf Proteininteraktionen haben [95-99]. Daraus kann geschlossen werden, dass WDR42A gewebespezifisch und differentiell posttranslational modifiziert werden könnte und dass diese PTMs Einfluss auf die MuRF Interaktion haben könnten. Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass WDR42A neben ubiquitären Funktionen auch gewebespezifische insbesondere muskelspezifische Funktionen haben könnte. Mit Ausnahme der 70 kDa großen WDR42A Isoform, kann andererseits zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht differenziert werden, ob die unterschiedlichen WDR42A-Proteinvarianten verschiedene Protein-Isoformen, mit PTM versehene Proteine oder schlichtweg Abbauprodukte darstellen.

4.2.4.2 WDR42A in der Muskelentwicklung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass WDR42A in der quergestreiften Muskulatur der Maus hergestellt wird, sollte zusätzlich überprüft werden, ob WDR42A auch in immortalisierten C2C12 Skelettmuskelzellen synthetisiert wird. Wie im Mausmodell konnten die beiden großen 70 und 80 kDa WDR42A Proteinvarianten detektiert werden (Abbildung 30). Außerdem konnte eine vermehrte Synthese von WDR42A nach Differenzierung von C2C12 Myoblasten (Muskelvorläuferzellen) zu ausdifferenzierten Myotuben (Muskelzellen) festgestellt werden (Abbildung 30). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass WDR42A eine funktionelle Bedeutung in der Muskeldifferenzierung hat. Zusätzlich durchgeführte Differenzierungsexperimente zeigen, dass WDR42A in der frühen Differenzierung involviert ist, da die Synthese schon nach 1-3 Tagen stark ansteigt und daraufhin gleichbleibend hoch liegt (Abbildung 32). Für andere DCAF-Proteine wurde nach meinem Wissensstand keine Involvierung in der Differenzierung von Vertebratagewebe insbesondere der Muskeldifferenzierung beschrieben. Da WDR42A neben dem Muskelgewebe ubiquitär in anderen Geweben differentiell synthetisiert wird, stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob WDR42A auch in der Differenzierung von anderen Geweben involviert sein könnte.

4.2.4.3 WDR42A ist ein vorwiegend zytoplasmatisches Protein

Es sollte überprüft werden, ob WDR42A und die MuRFs in Muskelzellen in den gleichen Zellkompartimenten lokalisiert sind. Diesbezüglich wurde zunächst die bis hierhin nicht

charakterisierte zelluläre Verteilung von WDR42A untersucht. Im Verlauf dieser Arbeit wurde jedoch die subzelluläre Lokalisierung von YFP sowie HA-markiertem WDR42A in COS-7 nicht-Muskelzellen publiziert [100]. WDR42A wurde durch Wu et al. (2012) als nukleo-zytoplasmatisches Protein mit vorwiegender Lokalisation im Zellkern beschrieben. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass WDR42A zwei Kernlokalisierungssignale (NLS, *nuclear localization signal*) sowie ein Kernexportsignal (NES, *nuclear export signal*) aufweist. Die Autoren konnten zudem darlegen, dass das erste N-terminale NLS1 und das NES funktionell aktiv sind. Durch spezifische Mutation des NLS1 wurde WDR42A, anstatt im Zellkern, hauptsächlich im Zytoplasma detektiert [100]. Diese Ergebnisse konnte ich nur partiell bestätigen.

Wie in Abschnitt 3.3.3 dargestellt, wurde eine vom Protein-Tag abhängige (GFP oder RFP) zelluläre Verteilung von WDR42A beobachtet. WDR42A lokalisiert als GFP Fusionsprotein ausschließlich im Zytoplasma, wohingegen es als RFP markiertes Protein im Zytoplasma und im Zellkern anzufinden ist (Abbildung 33). Warum die Verwendung dieser unterschiedlichen, jedoch auch sehr homologen Tags zu unterschiedlichen subzellulären Verteilungen des WDR42A-Proteins führen ist unklar. Diese Ergebnisse deuten jedoch an, dass der Tag einen Einfluss auf die Lokalisierung des Proteins haben kann. Zusätzlich konnte auch einen Einfluss der Position des verwendeten Protein-Tags (N- oder C-terminal) auf die WDR42A Lokalisation beobachtet werden. N-terminal GFP markiertes WDR42A weist eine zytoplasmatische Anordnung in kleinen punktierten Strukturen und C-terminal GFP markiertes WDR42A eine eher zytoplasmisch ubiquitäre Verteilungen auf (Abbildung 33). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass sowohl die Auswahl als auch die Position des verwendeten Tags die Verteilung und damit höchstwahrscheinlich auch die Funktion des Proteins beeinflusst. Aufgrund dessen ist nicht auszuschließen, dass die durch Wu et al. (2012) beschriebene Zellkernlokalisierung auf der Verwendung des YFP- oder HA-Tags beruht [100].

Um herauszufinden, ob WDR42A ein zytoplasmatisches oder nukleäres Protein ist, wurde anschließend die subzelluläre Verteilung von endogenem WDR42A untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass endogenes WDR42A in C2C12 Myoblasten und Myotuben in kleinen Punkten vorwiegend im Zytoplasma der Zellen lokalisiert (Abbildung 38). Diese Aufnahmen ähneln N-terminal GFP markiertem WDR42A (Abbildung 33). Diese Ergebnisse zeigen, dass WDR42A nicht wie bereits publiziert

vorwiegend im Kern [100], sondern eher im Zytoplasma lokalisiert ist. Andererseits könnte die beobachtete zytoplasmatische Verteilung von endogenem WDR42A muskelspezifisch sein. Die endogene Verteilung von WDR42A wurde in dieser Arbeit ausschließlich in C2C12 Muskelzellen untersucht. Zukünftige Arbeiten sollten überprüfen, ob die endogene Lokalisierung von WDR42A in unterschiedlichen Zelllinien divergiert.

4.2.4.4 WDR42A kolokalisiert mit MuRF1 und 3 im Zytoplasma von Muskelzellen

Anschließend sollte überprüft werden, ob die Interaktionspartner in Muskelzellen kolokalisieren. Wie in Abbildung 38 zu sehen ist, wurde eine Kolokalisation von endogenem MuRF1 mit endogenem WDR42A in kleinen punktförmigen Strukturen beobachtet. Zusätzlich zu den kolokalisierenden Proteinen wurden jeweils auch Fraktionen beider Proteine beobachtet, die nicht miteinander kolokalisieren. Dies bedeutet, dass nicht alle endogenen MuRF1 und WDR42A Proteine miteinander interagieren. Wie bereits angedeutet vermute ich, dass WDR42A Teil eines MuRF1-Multiproteinkomplexes sein könnte. Die molekulare Funktion von WDR42A in diesem Komplex kann bisher nur spekulativ diskutiert werden. Ich vermute, dass WDR42A entweder als Scaffolding-Protein oder als Substrat-Adapter fungiert oder das MuRF1 selber Substrat eines bisher nicht beschriebenen CRL4 Komplexes ist. In allen Fällen kann davon ausgegangen werden, dass diese Komplexe im Allgemeinen eher kurzlebig sind. Sie werden für den Ubiquitinierungsprozess gebildet und lösen sich nach der Ubiquitinierung des Substrat-Proteins wieder auf. Aufgrund dessen nehmen ich an, dass die MuRF1-WDR42A Interaktion nur für die Dauer des Ubiquitinierungsprozesses gebildet wird. Die beschriebenen Ergebnisse mit zwei unterschiedlichen Proteinfractionen, interagierenden und nicht interagierenden Proteinen, unterstützen diese These. Die endogene MuRF3-WDR42A Kolokalisation konnte nicht untersucht werden, da bisher kein funktioneller spezifischer MuRF3 Antikörper hergestellt wurde.

Endogenes WDR42A und endogenes MuRF1 kolokalisieren im verstärkten Maße in differenzierten C2C12 Myotuben (Abbildung 38). Während der Differenzierung von C2C12 Myoblasten zu Myotuben wird WDR42A vermehrt synthetisiert (Abbildung 30). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der bereits publizierte Hochregulation von MuRF1 in der Skelettmuskelentwicklung [79] und deuten darauf hin, dass MuRF1 verstärkt in differenzierten Skelettmuskelzellen mit WDR42A interagiert.

Des Weiteren konnte auch mit GFP bzw. RFP markierten Fusionsproteinen der Interaktionspartner MuRF1 und WDR42A eine Kolokalisation in C2C12 Myoblasten beobachtet werden. Diese Studien konnten mit C2C12 Myotuben nicht durchgeführt werden, da C2C12 Myotuben nur sehr schlecht transfizierbar sind. MuRF1 und WDR42A kolokalisierten in C2C12 Myoblasten ebenfalls in punktförmigen Strukturen (Abbildung 34). Die punktierten Strukturen der überexprimierten Fusionsproteine sind jedoch größer und beide Proteine kolokalisierten vollständig. Wie in anderen Studien spekuliert [35], vermute ich, dass diese MuRF1 Homooligomere darstellen und das WDR42A ebenfalls in diesen mit MuRF1 interagiert. Zusätzlich konnte ebenfalls eine Kolokalisation von MuRF3 mit WDR42A Fusionsproteinen in C2C12 Myoblasten beobachtet werden. Beide Proteine kolokalisierten miteinander im Zytosol der Myoblasten (Abbildung 35).

4.2.4.5 Die Interaktion von MuRF1 und WDR42A könnte durch PTMs reguliert werden

Als nächstes wurde untersucht, ob MuRF1 und WDR42A im zellfreien System direkt miteinander interagieren. Unter Verwendung von rekombinanten Fusionsproteinen (WDR42A-GST und MuRF1-MBP) konnte eine schwache direkte Wechselwirkung in GST Pull-Down Experimenten beobachtet werden (Abbildung 41). Ich vermute, dass die verwendeten Protein-Tags die direkte Interaktion beeinflusst haben. Diesbezüglich soll in zukünftigen Experimenten die direkte Bindung ohne bzw. nur mit einem Protein-Tag überprüft werden. Bisher war nur die Entfernung des GST-Tags von WDR42A (Abbildung 39), jedoch nicht des MBP-Tags von MuRF1 möglich. Aufgrund dessen soll in zukünftigen Experimenten ein MBP-MuRF1 Pull-Down mit Tag-freiem WDR42A durchgeführt werden. In Vorversuchen wurde beobachtet, dass Tag-freies WDR42A unspezifisch an die verwendete MBP-Amylose bindet (Daten nicht gezeigt). Diese unspezifische Bindungskapazität muss zunächst durch die Optimierung der Puffer-Bedingungen sowie Reaktionszeit verringert werden.

Für andere WD-Repeat Proteine wie beispielsweise *Coronin 1B* (CORO1B), *Receptor for activated C kinase 1* (RACK1) und *β -Transducin repeats-containing protein* (β -TrCP bzw. SCF β -TrCP) konnten starke Phosphorylierungen gezeigt werden, die Einfluss auf die Wechselwirkung mit anderen Proteinen haben [96-99]. Aufgrund dessen kann vermutet werden, dass die MuRF1-WDR42A Interaktion ebenfalls von Phosphorylierungen

abhängt. Zwei Ergebnisse deuten dies an: Erstens, dass rekombinant in *E. coli* hergestelltes und damit ohne PTMs synthetisiertes MuRF1 und WDR42A nur schwach miteinander interagieren und zweitens, dass eukaryotisch hergestellte und mit PTMs versehene Proteine dazu befähigt sind. Zusätzlich wurde in Gewebeexpressionsstudien (Abbildung 29) beobachtet, dass insbesondere die 70 kDa WDR42A Proteinvariante leichte gewebespezifische Größenunterschiede aufweist. Diese Ergebnisse deuten an, dass WDR42A ebenfalls posttranslational modifiziert wird. Zur Bestätigung dessen sind jedoch weiterführende Experimente erforderlich. Beispielsweise könnte eukaryotisch synthetisiertes WDR42A diesbezüglich mittels Massenspektrometrie analysiert werden. Zusätzlich könnten direkte Interaktionsstudien mit eukaryotisch hergestellten Proteinen (z.B. in Insektenzellen oder Muskelzellen) wiederholt werden. Problematisch ist dabei, dass Proteine in Insektenzellen zwar posttranslational modifiziert werden, jedoch oftmals nicht die Spezifität der Ursprungsorganismen bzw. Gewebe erhalten bleiben. Die Proteinsynthese in Muskelzellen ist ebenfalls problematisch, da die für die entsprechenden Experimente benötigten Proteinmengen oftmals nicht hergestellt werden können.

4.2.4.6 Verringerung der endogenen WDR42A Proteinmenge führt zu Atrophie-Resistenz in C2C12 Myotuben

Die E3-Ubiquitin-Ligase MuRF1 wird unter Skelettmuskelatrophie verstärkt synthetisiert [47]. Dies führt zu einem gesteigerten UPS-abhängigen Abbau von MuRF1 Substrat-Proteinen wie beispielsweise Aktin und Myosin (β /slow MHC) und im Zuge dessen zum Verlust von Muskelmasse [17, 42, 43, 51-53]. MuRF1 ist somit ein entscheidender Faktor in der Entwicklung von Skelettmuskelatrophie. Wird MuRF1 gezielt ausgeschaltet, führt dies zu Skelettmuskelatrophie-Resistenz [17, 47]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass MuRF1 mit WDR42A interagiert und das WDR42A ebenfalls in der Denervations-induzierten Skelettmuskelatrophie hochreguliert ist (Abbildung 44). Aufgrund dessen wurde angenommen, dass eine Herunterregulation von WDR42A ebenfalls zu einer Skelettmuskelatrophie-Resistenz führt. Wie in Abschnitt 4.2.4.6 beschrieben, konnte diese Annahme in C2C12 Myotuben bestätigt werden. Myotuben, in denen die WDR42A Proteinmenge durch siRNA herunterreguliert wurde, wiesen signifikant weniger Atrophie als Kontroll-Myotuben auf. Da MuRF1 in den atrophie-resistenten Myotuben vorhanden sein sollte und MuRF1 normalerweise für die Ausbildung von Atrophie von entscheidender Bedeutung ist, gehen ich davon aus, dass

MuRF1 ohne dessen Interaktionspartner WDR42A nicht oder vermindert funktionsfähig ist. Die molekularen Hintergründe dieser Vorgänge können zum jetzigen Zeitpunkt nur spekulativ diskutiert werden.

WDR42A besitzt sieben hintereinander angeordnete WD40-Repeats, die potentiell β -Propeller-Strukturen bilden könnten, welche in der Lage sind große Multiproteinkomplexe zu koordinieren. Falls WDR42A den Aufbau von MuRF1-Multiproteinkomplexen kontrolliert, können diese Komplexe nicht oder mit verminderter Geschwindigkeit gebildet werden. Unter dieser Annahme könnte MuRF1 ohne WDR42A nicht oder nur mit geringerer Geschwindigkeit die Ubiquitinierung von spezifischen Substrat-Proteinen katalysieren. Daraus resultierend wäre der Atrophie bedingte proteasomale Abbau von MuRF1 Substrat-Proteinen verringert, wodurch der Muskel weniger Atrophie ausbildet. Die Ergebnisse der Atrophie-Experimente deuten dies an. Zwei initiale Experimente könnten diese These weiter verstärken. Erstens sollten MuRF1 Substrat-Proteine in WT-Myotuben nach Atrophie-Induktion sehr viel stärker abgebaut werden als in Myotuben in denen WDR42A herunterreguliert wurde. Diese Proteinmengenunterschiede der MuRF1 Substrat-Proteine könnten mittels Massenspektrometrie oder spezifischen Antikörpern gegen die Substrat-Proteine im Immunblot erfasst werden. Zweitens sollte WDR42A tatsächlich den Aufbau von MuRF1 Multiproteinkomplexen als Scaffold-Protein koordinieren, müssten beide Proteine ähnliche Bindungspartner aufweisen. Folglich müssten in PPI-Screens mit WDR42A viele bereits bekannte MuRF1-Interaktionspartner identifiziert werden.

Andererseits wurde bereits gezeigt, dass WDR42A (DCAF8) homologe Proteine (DCAFs) als Substrat-Adapter bzw. Substrat-bindende Faktoren in CRL4-Komplexen agieren. Dies wurde für WDR42A noch nicht eindeutig gezeigt. Allerdings interagiert WDR42A mit den typischen CRL4-Komplex Proteinen Cullin4A und B sowie DDB1 [85]. Somit könnte WDR42A ebenfalls Substrat-Adapter in einem CRL4-Komplex sein. Ob WDR42A in Muskelzellen ebenfalls mit Cullin4A und B sowie DDB1 interagiert, wurde bisher noch nicht untersucht. Daraus folgend können zwei Thesen aufgestellt werden. Erstens könnte MuRF1 selbst ein Substrat-Protein in einem bisher unbekannten CRL4-Komplex sein und WDR42A in diesem als der entsprechende Substrat-Adapter fungieren. Diese Behauptung wird jedoch durch meine Ergebnisse nicht unterstützt. Wenn der Substrat-Adapter WDR42A fehlt, sollte nach dieser Überlegung das Substrat-Protein MuRF1

weniger abgebaut werden und folglich mehr MuRF1 in den Zellen vorhanden sein. Dies würde zu einem verstärkten Abbau von MuRF1-Substrat-Proteinen und somit zu einer massiveren Atrophie führen. Ich konnte das Gegenteil, also eine verminderte Atrophie nach WDR42A Herunterregulation beobachten (Abbildung 46). In zukünftigen Studien soll untersucht werden, ob WDR42A in Muskelzellen ebenfalls mit Cullin4A und B sowie DDB1 interagiert. Zweitens könnte WDR42A analog zu anderen CRL4-Komplexen in MuRF1-Multiproteinkomplexen als Substrat-Adapter fungieren. Unter dieser Annahme sollten MuRF1 Substrat-Proteine, wenn WDR42A nicht vorhanden ist, verlangsamt ubiquitiniert und degradiert werden, da der entsprechende Substrat-Adapter fehlen würde. Die Ergebnisse der Atrophie-Experimente, in denen nach WDR42A Herunterregulation weniger Atrophie gebildet wurde, weisen darauf hin. Nach dieser Hypothese sollten mit WDR42A in PPI-Screens bereits bekannte MuRF1-Substrat-Proteine identifiziert werden können. Nach meinem derzeitigen Wissensstand wurden bisher jedoch keine DCAF Substrat-Adapter-Proteine beschrieben, die unabhängig oder außerhalb von CRL4-Komplexen agieren.

Zusammengefasst wurde mit WDR42A ein neuer MuRF1 Interaktionspartner identifiziert, der entscheidenden Einfluss auf die Funktion von MuRF1 insbesondere in der Skelettmuskelatrophie hat. Da MuRF1 ein potentiell therapeutisches Ziel zur Eindämmung von Muskelatrophie darstellt, könnte durch die Hemmung der MuRF1-WDR42A Interaktion die Entwicklung von Skelettmuskelatrophie abgeschwächt werden. Zukünftige Arbeiten sollten darauf fokussiert sein, die molekularen Aspekte dieser Wechselwirkung genauer zu verstehen. Es besteht die Frage, ob WDR42A (DCAF8) als Scaffolding-Protein den Aufbau eines MuRF1-Multiproteinkomplex reguliert oder ob MuRF1 ein Substrat in einem bisher nicht beschriebenen CRL4^{DCAF8} Komplex ist. Ich favorisiere die erste These, da WDR42A die Stabilität von MuRF1 in CHX-Abbau-Experimenten nicht vermindert.

Literaturverzeichnis

1. Squire, J.M., *Architecture and function in the muscle sarcomere*. Curr Opin Struct Biol, 1997. **7**(2): p. 247-57.
2. Clark, K.A., et al., *Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2002. **18**: p. 637-706.
3. Lyon, R.C., S. Lange, and F. Sheikh, *Breaking down protein degradation mechanisms in cardiac muscle*. Trends Mol Med, 2013. **19**(4): p. 239-49.
4. Willis, M.S., et al., *The role of ubiquitin ligases in cardiac disease*. J Mol Cell Cardiol, 2013.
5. Bonaldo, P. and M. Sandri, *Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy*. Dis Model Mech, 2013. **6**(1): p. 25-39.
6. Schneider, M.F., *Control of calcium release in functioning skeletal muscle fibers*. Annu Rev Physiol, 1994. **56**: p. 463-84.
7. Franke, W.W., et al., *The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. I. Molecular definition in intercalated disks of cardiomyocytes by immunoelectron microscopy of desmosomal proteins*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(2): p. 69-82.
8. Borrmann, C.M., et al., *The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates. II. Colocalizations of desmosomal and fascia adhaerens molecules in the intercalated disk*. Eur J Cell Biol, 2006. **85**(6): p. 469-85.
9. Franke, W.W., et al., *The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates - III: assembly and disintegration of intercalated disks in rat cardiomyocytes growing in culture*. Eur J Cell Biol, 2007. **86**(3): p. 127-42.
10. Pieperhoff, S. and W.W. Franke, *The area composita of adhering junctions connecting heart muscle cells of vertebrates - IV: coalescence and amalgamation of desmosomal and adhaerens junction components - late processes in mammalian heart development*. Eur J Cell Biol, 2007. **86**(7): p. 377-91.
11. Severs, N.J., et al., *Remodelling of gap junctions and connexin expression in diseased myocardium*. Cardiovasc Res, 2008. **80**(1): p. 9-19.
12. Furst, D.O., et al., *The organization of titin filaments in the half-sarcomere revealed by monoclonal antibodies in immunoelectron microscopy: a map of ten*

- nonrepetitive epitopes starting at the Z line extends close to the M line.* J Cell Biol, 1988. **106**(5): p. 1563-72.
13. Granzier, H.L. and S. Labeit, *The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease.* Circ Res, 2004. **94**(3): p. 284-95.
 14. Huxley, H. and J. Hanson, *Changes in the cross-striations of muscle during contraction and stretch and their structural interpretation.* Nature, 1954. **173**(4412): p. 973-6.
 15. Huxley, A.F. and R. Niedergerke, *Structural changes in muscle during contraction; interference microscopy of living muscle fibres.* Nature, 1954. **173**(4412): p. 971-3.
 16. Gumucio, J.P. and C.L. Mendias, *Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia.* Endocrine, 2013. **43**(1): p. 12-21.
 17. Foletta, V.C., et al., *The role and regulation of MAFbx/atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle atrophy.* Pflugers Arch, 2011. **461**(3): p. 325-35.
 18. Portbury, A.L., M.S. Willis, and C. Patterson, *Tearin' up my heart: proteolysis in the cardiac sarcomere.* J Biol Chem, 2011. **286**(12): p. 9929-34.
 19. Hershko, A. and A. Ciechanover, *The ubiquitin system.* Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 425-79.
 20. Kravtsova-Ivantsiv, Y., T. Sommer, and A. Ciechanover, *The lysine48-based polyubiquitin chain proteasomal signal: not a single child anymore.* Angew Chem Int Ed Engl, 2013. **52**(1): p. 192-8.
 21. Komander, D., *The emerging complexity of protein ubiquitination.* Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 5): p. 937-53.
 22. Finley, D., *Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome.* Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 477-513.
 23. Reyes-Turcu, F.E., K.H. Ventii, and K.D. Wilkinson, *Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes.* Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 363-97.
 24. Lipkowitz, S. and A.M. Weissman, *RINGs of good and evil: RING finger ubiquitin ligases at the crossroads of tumour suppression and oncogenesis.* Nat Rev Cancer, 2011. **11**(9): p. 629-43.
 25. Pickart, C.M., *Back to the future with ubiquitin.* Cell, 2004. **116**(2): p. 181-90.
 26. Kanehisa, M., et al., *KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets.* Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D109-14.
 27. Kanehisa, M. and S. Goto, *KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes.* Nucleic Acids Res, 2000. **28**(1): p. 27-30.
 28. Dikic, I. and M. Robertson, *Ubiquitin ligases and beyond.* BMC Biol, 2012. **10**: p. 22.

-
29. Bernassola, F., et al., *The HECT family of E3 ubiquitin ligases: multiple players in cancer development*. Cancer Cell, 2008. **14**(1): p. 10-21.
 30. Metzger, M.B., V.A. Hristova, and A.M. Weissman, *HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 3): p. 531-7.
 31. Deshaies, R.J. and C.A. Joazeiro, *RING domain E3 ubiquitin ligases*. Annu Rev Biochem, 2009. **78**: p. 399-434.
 32. Spencer, J.A., et al., *Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein*. J Cell Biol, 2000. **150**(4): p. 771-84.
 33. Ikeda, K. and S. Inoue, *TRIM proteins as RING finger E3 ubiquitin ligases*. Adv Exp Med Biol, 2012. **770**: p. 27-37.
 34. Centner, T., et al., *Identification of muscle specific ring finger proteins as potential regulators of the titin kinase domain*. J Mol Biol, 2001. **306**(4): p. 717-26.
 35. McElhinny, A.S., et al., *Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1*. J Cell Biol, 2002. **157**(1): p. 125-36.
 36. Pizon, V., et al., *Transient association of titin and myosin with microtubules in nascent myofibrils directed by the MURF2 RING-finger protein*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 23): p. 4469-82.
 37. Lange, S., et al., *The kinase domain of titin controls muscle gene expression and protein turnover*. Science, 2005. **308**(5728): p. 1599-603.
 38. McElhinny, A.S., et al., *Muscle-specific RING finger-2 (MURF-2) is important for microtubule, intermediate filament and sarcomeric M-line maintenance in striated muscle development*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 15): p. 3175-88.
 39. Fielitz, J., et al., *Loss of muscle-specific RING-finger 3 predisposes the heart to cardiac rupture after myocardial infarction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(11): p. 4377-82.
 40. Kedar, V., et al., *Muscle-specific RING finger 1 is a bona fide ubiquitin ligase that degrades cardiac troponin I*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(52): p. 18135-40.
 41. Willis, M.S., M. Zungu, and C. Patterson, *Cardiac muscle ring finger-1--friend or foe?* Trends Cardiovasc Med, 2010. **20**(1): p. 12-6.
 42. Fielitz, J., et al., *Myosin accumulation and striated muscle myopathy result from the loss of muscle RING finger 1 and 3*. J Clin Invest, 2007. **117**(9): p. 2486-95.
 43. Polge, C., et al., *Muscle actin is polyubiquitinated in vitro and in vivo and targeted for breakdown by the E3 ligase MuRF1*. FASEB J, 2011. **25**(11): p. 3790-802.

-
44. Koyama, S., et al., *Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) as a connector of muscle energy metabolism and protein synthesis*. J Mol Biol, 2008. **376**(5): p. 1224-36.
 45. Witt, S.H., et al., *MURF-1 and MURF-2 target a specific subset of myofibrillar proteins redundantly: towards understanding MURF-dependent muscle ubiquitination*. J Mol Biol, 2005. **350**(4): p. 713-22.
 46. Bosanac, I., et al., *Modulation of K11-linkage formation by variable loop residues within UbcH5A*. J Mol Biol, 2011. **408**(3): p. 420-31.
 47. Bodine, S.C., et al., *Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1704-8.
 48. Willis, M.S., et al., *Muscle ring finger 1, but not muscle ring finger 2, regulates cardiac hypertrophy in vivo*. Circ Res, 2007. **100**(4): p. 456-9.
 49. Witt, C.C., et al., *Cooperative control of striated muscle mass and metabolism by MuRF1 and MuRF2*. EMBO J, 2008. **27**(2): p. 350-60.
 50. Willis, M.S., et al., *Muscle ring finger 1 and muscle ring finger 2 are necessary but functionally redundant during developmental cardiac growth and regulate E2F1-mediated gene expression in vivo*. Cell Biochem Funct, 2013.
 51. Clarke, B.A., et al., *The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle*. Cell Metab, 2007. **6**(5): p. 376-85.
 52. Cohen, S., et al., *During muscle atrophy, thick, but not thin, filament components are degraded by MuRF1-dependent ubiquitylation*. J Cell Biol, 2009. **185**(6): p. 1083-95.
 53. Labeit, S., et al., *Modulation of muscle atrophy, fatigue and MLC phosphorylation by MuRF1 as indicated by hindlimb suspension studies on MuRF1-KO mice*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 693741.
 54. Eddins, M.J., et al., *Targeting the ubiquitin E3 ligase MuRF1 to inhibit muscle atrophy*. Cell Biochem Biophys, 2011. **60**(1-2): p. 113-8.
 55. Könn, M., *Creating a protein-protein interaction network for alpha-synuclein*. Dissertation, 2012. **Freie Universität Berlin**.
 56. Fields, S. and O. Song, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature, 1989. **340**(6230): p. 245-6.
 57. Mockli, N., et al., *Yeast split-ubiquitin-based cytosolic screening system to detect interactions between transcriptionally active proteins*. Biotechniques, 2007. **42**(6): p. 725-30.
 58. Stelzl, U., et al., *A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome*. Cell, 2005. **122**(6): p. 957-68.
 59. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

-
60. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
 61. Hirner, S., et al., *MuRF1-dependent regulation of systemic carbohydrate metabolism as revealed from transgenic mouse studies*. J Mol Biol, 2008. **379**(4): p. 666-77.
 62. Loch, C.M. and J.E. Strickler, *A microarray of ubiquitylated proteins for profiling deubiquitylase activity reveals the critical roles of both chain and substrate*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1823**(11): p. 2069-78.
 63. Woodsmith, J., R.C. Jenn, and C.M. Sanderson, *Systematic analysis of dimeric E3-RING interactions reveals increased combinatorial complexity in human ubiquitination networks*. Mol Cell Proteomics, 2012. **11**(7): p. M111 016162.
 64. Kimes, B.W. and B.L. Brandt, *Properties of a clonal muscle cell line from rat heart*. Exp Cell Res, 1976. **98**(2): p. 367-81.
 65. Watkins, S.J., G.M. Borthwick, and H.M. Arthur, *The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2011. **47**(2): p. 125-31.
 66. Ranaweera, R.S. and X. Yang, *Auto-ubiquitination of Mdm2 enhances its substrate ubiquitin ligase activity*. J Biol Chem, 2013. **288**(26): p. 18939-46.
 67. Scaglione, K.M., et al., *SCF E3-mediated autoubiquitination negatively regulates activity of Cdc34 E2 but plays a nonessential role in the catalytic cycle in vitro and in vivo*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(16): p. 5860-70.
 68. Amemiya, Y., P. Azmi, and A. Seth, *Autoubiquitination of BCA2 RING E3 ligase regulates its own stability and affects cell migration*. Mol Cancer Res, 2008. **6**(9): p. 1385-96.
 69. Blom, N., S. Gammeltoft, and S. Brunak, *Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites*. J Mol Biol, 1999. **294**(5): p. 1351-62.
 70. Stirnimann, C.U., et al., *WD40 proteins propel cellular networks*. Trends Biochem Sci, 2010. **35**(10): p. 565-74.
 71. Magrane, M. and U. Consortium, *UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data*. Database (Oxford), 2011. **2011**: p. bar009.
 72. deAlmeida, A.C., R.J. van Oort, and X.H. Wehrens, *Transverse aortic constriction in mice*. J Vis Exp, 2010(38).
 73. Arya, R., et al., *Muscle ring finger protein-1 inhibits PKC{epsilon} activation and prevents cardiomyocyte hypertrophy*. J Cell Biol, 2004. **167**(6): p. 1147-59.
 74. Gingras, A.C., et al., *Analysis of protein complexes using mass spectrometry*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(8): p. 645-54.

-
75. Imami, K., et al., *Quantitative proteome and phosphoproteome analyses of cultured cells based on SILAC labeling without requirement of serum dialysis*. Mol Biosyst, 2010. **6**(3): p. 594-602.
 76. Ong, S.E. and M. Mann, *A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC)*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2650-60.
 77. Hor, S., et al., *Stable isotope labeling by amino acids in cell culture and differential plasma membrane proteome quantitation identify new substrates for the MARCH9 transmembrane E3 ligase*. Mol Cell Proteomics, 2009. **8**(8): p. 1959-71.
 78. Selbach, M. and M. Mann, *Protein interaction screening by quantitative immunoprecipitation combined with knockdown (QUICK)*. Nat Methods, 2006. **3**(12): p. 981-3.
 79. Perera, S., B. Mankoo, and M. Gautel, *Developmental regulation of MURF E3 ubiquitin ligases in skeletal muscle*. J Muscle Res Cell Motil, 2012. **33**(2): p. 107-22.
 80. Ratmann, O., C. Wiuf, and J.W. Pinney, *From evidence to inference: probing the evolution of protein interaction networks*. HFSP J, 2009. **3**(5): p. 290-306.
 81. Yu, X., et al., *Categorizing biases in high-confidence high-throughput protein-protein interaction data sets*. Mol Cell Proteomics, 2011. **10**(12): p. M111 012500.
 82. Bruckner, A., et al., *Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology*. Int J Mol Sci, 2009. **10**(6): p. 2763-88.
 83. Yu, H., et al., *High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network*. Science, 2008. **322**(5898): p. 104-10.
 84. Sha, D., L.S. Chin, and L. Li, *Phosphorylation of parkin by Parkinson disease-linked kinase PINK1 activates parkin E3 ligase function and NF-kappaB signaling*. Hum Mol Genet, 2010. **19**(2): p. 352-63.
 85. Jin, J., et al., *A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1*. Mol Cell, 2006. **23**(5): p. 709-21.
 86. Fredrickson, E.K., et al., *Means of self-preservation: how an intrinsically disordered ubiquitin-protein ligase averts self-destruction*. Mol Biol Cell, 2013. **24**(7): p. 1041-52.
 87. Sztalryd, C., et al., *Perilipin A is essential for the translocation of hormone-sensitive lipase during lipolytic activation*. J Cell Biol, 2003. **161**(6): p. 1093-103.
 88. Akimoto, N., et al., *Expression of perilipin A on the surface of lipid droplets increases along with the differentiation of hamster sebocytes in vivo and in vitro*. J Invest Dermatol, 2005. **124**(6): p. 1127-33.
 89. Davis, J.S., et al., *The overall pattern of cardiac contraction depends on a spatial gradient of myosin regulatory light chain phosphorylation*. Cell, 2001. **107**(5): p. 631-41.

-
90. Gautel, M., *Cytoskeletal protein kinases: titin and its relations in mechanosensing*. Pflügers Arch, 2011. **462**(1): p. 119-34.
 91. Peck, S.C., *Analysis of protein phosphorylation: methods and strategies for studying kinases and substrates*. Plant J, 2006. **45**(4): p. 512-22.
 92. van der Voorn, L. and H.L. Ploegh, *The WD-40 repeat*. FEBS Lett, 1992. **307**(2): p. 131-4.
 93. Li, D. and R. Roberts, *WD-repeat proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(14): p. 2085-97.
 94. Lee, J. and P. Zhou, *DCAFs, the missing link of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase*. Mol Cell, 2007. **26**(6): p. 775-80.
 95. Rossi, M., et al., *Regulation of the CRL4(Cdt2) ubiquitin ligase and cell-cycle exit by the SCF(Fbxo11) ubiquitin ligase*. Mol Cell, 2013. **49**(6): p. 1159-66.
 96. Cai, L., et al., *Phosphorylation of coronin 1B by protein kinase C regulates interaction with Arp2/3 and cell motility*. J Biol Chem, 2005. **280**(36): p. 31913-23.
 97. Chang, B.Y., M. Chiang, and C.A. Cartwright, *The interaction of Src and RACK1 is enhanced by activation of protein kinase C and tyrosine phosphorylation of RACK1*. J Biol Chem, 2001. **276**(23): p. 20346-56.
 98. Adams, D.R., D. Ron, and P.A. Kiely, *RACK1, A multifaceted scaffolding protein: Structure and function*. Cell Commun Signal, 2011. **9**: p. 22.
 99. Wang, Z., et al., *DEPTOR ubiquitination and destruction by SCF(beta-TrCP)*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. **303**(2): p. E163-9.
 100. Wu, F., et al., *Characterization of nuclear import and export signals determining the subcellular localization of WD repeat-containing protein 42A (WDR42A)*. FEBS Lett, 2012. **586**(8): p. 1079-85.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μF	Mikrofarad
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
A	Ampere
Ab	Antibiotikum
Abk.	Abkürzung
AdV	Adenovirus
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	<i>affinity purification</i> , dt. Affinitäts-Aufreinigung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	<i>Acidic rich</i>
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
β-Gal	β-Galactosidase
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , dt. Rinderserumalbumin
Cc	<i>Coiled coil</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , dt. komplementäre DNS
Chlor	Chloramphenicol
CHX	Cycloheximid
COPD	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i>
CRL4	Cullin4-RING-Ubiquitin-Ligase
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , dt. Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DUB	Deubiquitinierendes Enzym
E1	Ubiquitin-aktivierendes Enzym
E2	Ubiquitin konjugierendes Enzym
E3	Ubiquitin-Ligase
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDL	<i>Musculus extensor digitorum longus</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluorescein Isothiocyanate

FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
g	Gravitation
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , dt. grün fluoreszierende Protein
ggf.	Gegebenenfalls
Gln	Glutamin
GOI	<i>Gene of interest</i>
GP	Gastrocnemius plantaris
GST	Glutathion-S-Transferase
h	<i>hour</i> , dt. Stunde
HA	Hämagglutinin
H/L	<i>Heavy/Light</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , dt. Meerrettichperoxidase
Hs	<i>Homo Sapiens</i>
i.d.R.	In der Regel
Iap	Interaktionspartner
IB	Immunblot
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kana	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
Ko-IP	Ko-Immunpräzipitation
L	Liter
LB-Medium	<i>Lysogeny broth</i> Medium
LV	Linker Ventrikel
Lys	Lysin
mA	Milliampere
MBP	Maltose-bindendes protein
MDC	Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin-Buch
MFCD	<i>MuRF-family-conserved domain</i>
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
Mm	<i>Mus musculus</i>
mM	Millimolar
MOI	<i>multiplicity of infection</i> , dt. Multiplizität der Infektion
MS	Massenspektrometrie
NES	<i>Nuclear export signal</i> , dt. Kernexportsignal
ng	Nanogramm
NLS	<i>nuclear localization signal</i> , dt. Kernlokalisierungssignal
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
ORF	<i>Open reading frame</i> , dt. Offener Leserahmen
pAk	primärer Antikörper

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , dt. Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin-Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
Pp	Phosphatpuffer
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PTM	Posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RFP	<i>Red fluorescent protein</i> , dt. rot fluoreszierende Protein
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , dt. Ribonukleinsäure
rpm	<i>Revolutions per minute</i> , dt. Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RV	Rechter Ventrikel
sAk	sekundärer Antikörper
SCF	Skp1, Cullin, F-box
SDS	Sodium dodecyl sulfate, dt. Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Ser	Serin
SFM	Serumfreies-Medium
SILAC	<i>Stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SOC-Medium	<i>Super Optimal Broth</i> (SOB) Medium mit Glukose
Sol	<i>Musculus Soleus</i>
SR	sarkoplasmatische Retikulum
TA	<i>Tibialis anterior</i>
TAC	<i>Transverse aortic constriction</i> , dt. transverse Aorten-Konstriktion
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TB-Medium	<i>Terrific Broth</i> Medium
TBT	<i>Tris buffer with Tween</i> , dt. Tris-Puffer mit Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamine B isothiocyanate
Triton X-100	Polyethylenglykol-[4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)phenyl]-ether
U	Units (Enzymaktivität)
Ub	Ubiquitin
ÜN	Über Nacht
ÜNK	Über Nacht Kultur
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
USP	Ubiquitin spezifische peptidase
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> , dt. Volumen pro Volumen
w/v	<i>weight per volume</i> , dt. Gewicht pro Volumen
WB	<i>Western Blot</i> , dt. Immunblot
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
Y2H	<i>Yeast Two-Hybrid</i> , dt. Hefe-Zwei-Hybrid
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i> , dt. gelb fluoreszierende Protein

Abbildungsverzeichnis

1	Der Ubiquitinierungs-Mechanismus.....	6
2	E3-Ubiquitin-Ligase Typen.....	8
3	Domänenstruktur der MuRF-Proteine.....	9
4	MuRF Domänen-Teilkonstrukte als Köder in Y2H-Screens.....	38
5	Vergleich der drei MuRF1 Domänen-Screens.....	43
6	Vergleich der MuRF1 und 2 mit den MuRF3 Y2H-Screens.....	43
7	AdV-GFP Transduktionstests.....	45
8	Testexpressionen mit AdV-MuRFs in H9c2-Zellen.....	46
9	Affinitätschromatographische Reinigung der SILAC markierten MuRF-Proteine..	47
10	Vergleich der Y2H und SILAC-AP-MS Datensätze.....	51
11	MuRF Ko-IP Ergebnisse (1).....	55
12	MuRF Ko-IP Ergebnisse (2).....	56
13	Cycloheximid-Abbau-Experimente in COS-7-Zellen mit MuRFs und WDR42A.....	58
14	Cycloheximid-Abbau-Experimente mit MuRFs und MYLK2 in COS-7-Zellen.....	59
15	Cycloheximid-Abbau-Experimente mit MuRF1 und HDAC10 sowie USP35.....	60
16	Bestätigung der MuRF-MuRF Interaktionen mittels Ko-Immunpräzipitationen....	61
17	Lokalisierung von C-terminal GFP markiertem MuRF1 in H9c2 Zellen.....	63
18	Lokalisierung von N-terminal RFP markiertem MuRF2 in H9c2 Zellen.....	63
19	Lokalisierung von C-terminal RFP markiertem MuRF2 in H9c2 Zellen.....	64
20	Lokalisierung von N- und C-terminal RFP markiertem MuRF3 in H9c2 Zellen.....	64
21	Kolokalisierung von MuRF1 und 2 in H9c2 Zellen.....	66
22	Kolokalisierung von MuRF1 und 3 in H9c2 Zellen.....	66
23	Vergleich der MuRF1 Lokalisation ohne und mit MuRF3 Ko-Expression.....	67
24	Kolokalisierung von MuRF2 und 3 in H9c2 Zellen.....	67
25	Ko-Expressionsstudien mit MuRFs in COS-7 nicht-Muskelzellen.....	68
26	Ko-Expressionsstudien mit MuRFs in C2C12 Muskelzellen.....	68
27	MuRF1 weist konservierte potentielle Phosphorylierungsstellen auf.....	70
28	<i>Mobility shift assays</i> mit MuRF1 und MYLK2.....	71
29	Synthese von WDR42A in verschiedenen Geweben der Maus.....	73
30	WDR42A wird in C2C12 Myoblasten und Myotuben synthetisiert.....	74
31	Effiziente siRNA-Herunterregulation der beiden WDR42A Proteinvarianten.....	75
32	Die WDR42A Proteinmenge steigt in der frühen C2C12 Differenzierung stark an	75
33	Lokalisation von GFP und RFP markiertem WDR42A in C2C12 Zellen.....	77
34	Kolokalisation von MuRF1 und WDR42A in C2C12 Zellen.....	78
35	Kolokalisation von MuRF3 und WDR42A in C2C12 Zellen.....	78
36	Kolokalisation von MuRF1 und WDR42A in COS-7 Zellen.....	78
37	Kolokalisation von MuRF3 und WDR42A in COS-7 Zellen.....	79
38	Kolokalisation von endogenem MuRF1 und WDR42A in C2C12 Zellen.....	80

39	Aufreinigung von rekombinantem WDR42A-GST.....	82
40	Aufreinigung von rekombinantem MuRF1-MBP.....	83
41	Direkte Interaktionsstudien mit MuRF1 und WDR42A.....	84
42	WDR42A wird nicht differentiell synthetisiert durch TAC induzierte Herzmuskelhypertrophie in WT-Mäusen.....	85
43	Die Synthese von WDR42A ändert sich nicht in Hunger-induzierter Skelettmuskelatrophie.....	85
44	Die Synthese von WDR42A wird durch Denervations-induzierte Skelettmuskelatrophie gesteigert.....	86
45	siRNA-vermittelte Herunterregulation von WDR42A in C2C12 Myotuben.....	87
46	siRNA-vermittelte Herunterregulation von WDR42A in C2C12 Myotuben führt zu Atrophie-Resistenz.....	88
47	siRNA-vermittelte Herunterregulation von WDR42A führt zu Atrophie- Resistenz in C2C12 Myotuben.....	89

Tabellenverzeichnis

1	Geräte.....	14
2	Bakterienstämme.....	15
3	Zelllinien.....	15
4	Adenoviren.....	16
5	Plasmide.....	16
6	Oligonukleotide.....	16
7	siRNAs.....	18
8	Kulturmedien für die Bakterienanzucht.....	18
9	Zellkulturmedien.....	19
10	Primäre Antikörper.....	19
11	Sekundäre Antikörper.....	19
12	Fluoreszenzmikroskop Filtersätze.....	20
13	Fluoreszenzmikroskop Objektive.....	20
14	Thermocycler-Programm für DNA-Amplifikationen.....	21
15	JETstar System Puffer.....	23
16	Verwendete Puffer in der SDS-PAGE Gelelektrophorese.....	26
17	Im Immunblot verwendete Lösungen und Puffer.....	27
18	Verwendete Phosphatpuffer für Affinitätschromatographien.....	28
19	Synthese rekombinanter Proteine.....	30
20	Auto-Aktivitätstests und Zusammenfassung der Y2H-Screens.....	39
21	Auswahl der mit MuRF1 und 2 Domänen-Teilkonstrukten identifizierten positiven Klone.....	40
22	Auswahl der mit MuRF3-volle Länge identifizierten positiven Klone.....	41
23	Ausgewählte Ergebnisse des MuRF3-Cc-AR Screens.....	42
24	Ergebnisse der SILAC-AP-MS Screens.....	47
25	Ausgewählte Ergebnisse der durchgeführten MuRF-SILAC-AP-MS Experimente..	48
26	Fortsetzung Ausgewählte Ergebnisse der MuRF-SILAC-AP-MS Experimente.....	49
27	Mit beiden Screening-Methoden identifizierte Proteine.....	52
28	Zusammenfassung der Ko-IP-Ergebnisse.....	54

Publikationen und Vorträge

Publikationen:

Lodka D, Pahuja A, Geers-Knörr C, Purfürst B, Hamati J, Nowak M, Köhncke C, Schmidt S, Labeit S, Morano I, Heuser A, Glass DJ, Kraft T, Bassel-Duby R, Olson EN, Sommer T, Fielitz J. The E3 ubiquitin ligases Muscle RING-finger 2 and 3 coordinately regulate maintenance of skeletal muscle and cardiac structure and function. Manuskript erstellt.

Vorträge:

Regulation of degradation complex assembly of E3 ubiquitin ligases MuRF1 and 3 in striated muscle cells. Cold Spring Harbor Laboratory Conference: The ubiquitin family. Mai 2013.

Muscle RING-finger E3 ubiquitin ligases (MuRFs) function in a multisubunit degradation complex to regulate myocyte function. Wollenberger Seminar, MDC Berlin-Buch. Mai 2012

Identification of novel MuRF degradation complex associated proteins. Cancer Club, MDC Berlin-Buch. Oktober 2013

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Thomas Sommer und PD Dr. med. Jens Fielitz einerseits für die Vergabe dieser spannenden Promotionsarbeit sowie andererseits für die kontinuierliche wissenschaftliche Diskussion und Betreuung meiner Arbeit danken.

Des Weiteren möchte ich den Wissenschaftlichen Mitarbeitern Herrn Dr. Ernst Jarosch, Dr. Christian Hirsch, Dr. Sathish Kumar Lakshmipathy und Frau Dr. Melanie Kny für die hilfreichen Anregungen bezüglich der Planung, Durchführung und Deutung von einzelnen Experimenten danken.

Ausdrücklich danken möchte ich den zahlreichen aktuellen sowie ehemaligen Mitarbeitern der AG Sommer und der AG Fielitz für die ausgesprochen gute Arbeitsatmosphäre und die kollegiale Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. Erich Wanker und Mitarbeitern möchte ich für die Hilfe bei der Durchführung der Y2H-Experimente und Herrn Dr. Gunnar Dittmar und Mitarbeitern für die Hilfe bei den massenspektrometrischen Messungen danken.

Unendlich großer Dank gilt meiner Freundin Nicole Ehlscheid. Sie war immer für mich da, hat alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit miterlebt, Aufbauhilfe geleistet, motiviert und sich in Erfolgsmomenten mit mir gefreut. Abschließend möchte ich insbesondere meiner Mutter Marion Nowak für die uneingeschränkte Hilfe in allen mir erdenklichen Lebenslagen danken. Ohne sie wäre das Studium der Biologie als auch die Durchführung dieser Promotionsarbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen und Hilfsmittel verfasst zu haben.

Ich erkläre mich nicht anderwärtig um einen Doktorgrad beworben zu haben bzw. einen entsprechenden Doktorgrad zu besitzen.

Ich habe die dem Verfahren zugrunde liegende Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin zur Kenntnis genommen.